

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/EP05/050479

International filing date: 04 February 2005 (04.02.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: DE

Number: 102004005885.7

Filing date: 05 February 2004 (05.02.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 19 May 2005 (19.05.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse



**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung**

Aktenzeichen:

10 2004 005 885.7

Anmeldetag:

05. Februar 2004

Anmelder/Inhaber:

RHEINISCHE FRIEDRICH-WILHELMUS-
UNIVERSITÄT BONN, 53113 Bonn/DE

Bezeichnung:

Mutierte DNA-Polymerasen mit erhöhter
Fehlpaarungs-Diskriminierung

IPC:

C 12 N, C 12 Q

**Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ur-
sprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.**

München, den 28. April 2005
Deutsches Patent- und Markenamt

Der Präsident

Im Auftrag

Faust

040123de/JH/BM

Mutierte DNA-Polymerasen mit erhöhter Fehlpaarungs-Diskriminierung

Die vorliegende Erfindung betrifft DNA-Polymerasen mit einer speziellen Mutation, die eine erhöhte Fehlpaarungs-Diskriminierung aufweisen, deren Herstellung und Verwendung. Die thermostabilen DNA-Polymerasen mit dieser Mutation sind besonders für diagnostische und molekularbiologische Verfahren, z.B. allel-spezifische PCR geeignet.

Hintergrund der Erfindung

Seit der Vorstellung der ersten menschlichen Genomsequenzen konzentriert sich die Forschung auf die Entdeckung genetischer Unterschiede zwischen den Individuen wie z.B. Einzelbasenmutationen ("single nucleotide polymorphisms" SNP's). Dies ist von Interesse, da zunehmend ersichtlich wird, dass Einzelbasenvariationen im Genom mit unterschiedlicher Arzneimittelverträglichkeit oder Prädisposition für verschiedenste Krankheiten verknüpft sind. In Zukunft könnte die Kenntnis medizinisch relevanter Nukleotidvariationen es ermöglichen, Therapien auf die individuelle genetische Ausstattung anzupassen und die Behandlung mit Medikamenten, die ineffektiv sind oder sogar zu Nebenwirkungen führen, könnte verhindert werden (Shi, Expert Rev. Mol. Diagn. 1, 363-365 (2001)). Es ist offensichtlich, dass Entwicklungen, die eine zeit- und kosten-effiziente Identifizierung von Nukleotidvariationen ermöglichen, zu weiteren Fortschritten in der Pharmakogenetik führen.

SNPs machen den größten Teil der genetischen Variationen im menschlichen Genom aus, und sind die Ursache für über 90% der Unterschiede zwischen Individuen (Kwok, Annu. Rev. Genomics Hum. Genet 2, 235-258 (2001); Kwok und Chen, Curr. Issues Mol. Biol. 5, 43-60 (2003); Twyman and Primrose, Pharmacogenomics 4, 67-79 (2003)). Zum Nachweis solcher genetischer Variationen und anderer Nukleinsäure-Varianten wie Mutationen können verschiedene Verfahren eingesetzt werden. Beispielsweise kann die Identifikation der Variante einer Target-Nukleinsäure durch Hybridisation der zu analysierenden Nukleinsäure-Probe mit einer Sequenzvarianten-spezifischen Hybridisationssonde unter geeigneten Hybridisationsbedingungen erfolgen (Guo et al., Nat. Biotechnol. 15, 331-335 (1997)).

Es hat sich jedoch herausgestellt, dass derartige Hybridisierungsmethoden, insbesondere den klinischen Anforderungen hinsichtlich der erforderlichen Sensitivität derartiger Assays, nicht genügen. Deshalb hat zum Nachweis von Mutationen, Single-Nukleotid-Polymorphismen (SNP) sowie anderen allelischen Sequenzvarianten insbesondere auch die PCR (Saiki et al., *Science* 239, 487-490 (1988)) breiten Eingang in molekular-biologische und diagnostische Untersuchungsverfahren gefunden, wobei eine im Hinblick auf die Existenz einer Variante zu untersuchende Target-Nukleinsäure durch eine Polymerase-Kettenreaktion vor der Hybridisierung amplifiziert wird. Als Hybridisationssonden für derartige Assays werden in der Regel einzelsträngige Oligonukleotide verwendet. Eine abgewandelte Ausführungsform dieser Assays sind solche, die fluoreszierende Hybridisationssonden einsetzen (Livak, *Genet Anal.* 14, 143-149 (1999)). Generell wird angestrebt Verfahren zur Bestimmung SNPs und andern Sequenzvariationen zu automatisieren (*Gut, Hum. Mutat.* 17, 475-492 (2001)).

Eine bereits im Stand der Technik bekannte Alternative zur Sequenzvarianten-spezifischen Hybridisierung bietet die sogenannte Allel-spezifische Amplifikation (Newton et al., *Nucleic Acids Res.* 17, 2503-2516 (1989); Germer et al., *genome res.* 10, 258-266 (2000); Gibbs et al., *Nucleic Acids Res.* 17, 2437-2448 (1989); Wu et al., *PNAS* 86, 2757-2769 (1989); Ishikawa et al., *Hum. Immunol.* 42, 315-318 (1995)). Bei diesem Nachweisverfahren werden bereits während der Amplifikation Varianten-spezifische Amplifikationsprimer eingesetzt, die in der Regel am 3' terminalen Ende des Primers einen sog. diskriminierenden terminalen Nukleotidrest besitzen, welcher lediglich komplementär zu nur einer speziellen Variante der nachzuweisenden Target-Nukleinsäure ist. Bei dieser Methode werden Nukleotidvariationen durch die An- oder Abwesenheit von DNA Produkt nach der PCR Amplifikation bestimmt. Das Prinzip der Allel-spezifische Amplifikation basiert auf der Ausbildung von kanonischen oder nicht kanonischen Primer-Template Komplexen am Ende von allel-spezifischen Primersonden. An einem korrekt gepaarten 3'-Primerende kann die Amplifikation durch eine DNA-Polymerase stattfinden, bei einem fehlgepaarten Primerende hingegen sollte die Verlängerung gehemmt sein.

US 5,595,890 beschreibt beispielsweise derartige Verfahren zur Allel-spezifischen Amplifikation sowie deren Anwendung zum Nachweis von klinisch relevanten Punktmutationen, beispielsweise im k-ras-Onkogen. US 5,521,301 beschreibt ebenfalls Verfahren zu Allel-spezifischen Amplifikation zur Genotypisierung des

AB0-Blutgruppensystems. US 5,639,611 offenbart dagegen die Verwendung Allel-spezifischer Amplifikation im Zusammenhang mit dem Nachweis der für Sichelzell-Anämie verantwortlichen Punktmutation.

Die Allel-spezifische Amplifikation ist jedoch insofern problematisch, das sie sich durch eine nur geringe Selektivität aufzeichnet, wodurch weitere, aufwendige und damit zeit- und kostenintensive Optimierungsschritte bedingt werden.

Derartige Verfahren zum Nachweis von Sequenzvarianten, Polymorphismen und vor allem Punktmutationen erfordern insbesondere dann eine Allel-spezifische Amplifikation, wenn sich die nachzuweisende Sequenzvariante im Unterschuss verglichen mit einer im Überschuss vorhandenen Variante desselben Nukleinsäureabschnitts (bzw. desselben Gens) befindet.

Eine derartige Situation ist beispielsweise dann gegeben, wenn mit Hilfe von Allel-spezifischer Amplifikation disseminierte Tumorzellen in Körperflüssigkeiten wie Blut, Serum oder Plasma nachgewiesen werden soll (US 5,496,699). Zu diesem Zweck wird zunächst DNA aus Körperflüssigkeiten wie Blut, Serum oder Plasma isoliert, welche sich aus einem Unterschuss DNA an disseminierten Tumorzellen sowie einem Überschuss an DNA aus nicht proliferierenden Zellen zusammensetzt. Die für die tumorale DNA signifikanten Mutationen im k-Ras Gen müssen somit aufgrund von wenigen Kopien tumoraler DNA in Gegenwart eines Überschusses an Wildtyp DNA nachgewiesen werden.

Alle im Stand der Technik beschriebenen Verfahren zur Allel-spezifischen Amplifikation haben den Nachteil, dass trotz der Verwendung von 3' diskriminierenden Nukleotidresten eine Primerextension in Gegenwart einer geeigneten DNA Polymerase in geringerem Umfang auch dann erfolgt, wenn die Target-Nukleinsäure nicht exakt der nachzuweisenden Sequenzvariante entspricht, d. h., sich von dieser zumindest in dem zum diskriminierenden Nukleotidrest komplementären Nukleotid unterscheidet. Dies führt insbesondere dann zu falsch-positiven Ergebnissen, wenn eine bestimmte Sequenzvariante in einem Überschuss-Background von Nukleinsäuren enthaltend eine andere Sequenzvariante nachgewiesen werden soll. Dies ist wie oben erwähnt beispielsweise bei der Detektion von bestimmten k-Ras-Allelen als Indikator für disseminierte Tumorzellen der Fall. Ein weiterer Nachteil der bekannten Verfahren besteht darin, daß in jedem Falle ein 3' terminal diskriminierender Oligonukleotidrest verwendet werden muß. Maßgeblich für die Nachteile dieser auf PCR basierenden Verfahren ist die Unfähigkeit der in diesen Verfahren eingesetzten Polymerasen ausreichend zwischen Ba-

senfehlpaarungen zu diskriminieren. Bislang war es daher nicht möglich direkt durch PCR eine eindeutige Aussage über die An- bzw. Abwesenheit einer Mutation zu machen. Es bedarf bislang immer weiterer zeit- und kostenintensive Aufreinigungs- und Analyseverfahren für eine eindeutige Diagnose solcher Mutationen. Daher werden Neuerungen, die eine Erhöhung der Selektivität der Allel-spezifischen PCR Amplifikation ermöglichen, einen signifikanten Einfluss auf Verlässlichkeit und Robustheit der direkten SNP-Analyse durch die PCR.

Andererseits werden bereits eine Reihe von Modifikationen in der Proteinsequenz der DNA-Polymerasen I beschrieben. So erwähnt das US-Patent 6,329,178 DNA-Polymerasemutanten mit geänderter katalytischer Aktivität, bei denen Mutationen in dem A-Motiv (der hochkonservierten Sequenz DYSQIELR) erfolgt waren. Darüber hinaus beschreibt Minnick, T. et al., J. Biol. Chem. 274, 3067 – 3075 (1999) eine Vielzahl von *E.-coli*-DNA-Polymerase-I-(Klenow-Fragment)-Mutanten, bei denen Alaninaustausche vorgenommen wurde. Ein Teil der beschriebenen Mutanten zeigt eine höhere Polymerase-Genauigkeit, bezogen auf den Wildtyp. Eine der erwähnten Mutanten ist H881A; besondere Eigenschaften dieser Mutanten in Bezug auf die anderen beschriebenen Mutanten werden nicht aufgeführt.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es deshalb, Sequenzvarianten mit erhöhter Spezifität bereitzustellen, mit deren Hilfe ein Sequenzvarianten-spezifisches Nachweisverfahren ermöglicht wird.

Kurzbeschreibung der Erfindung

Es wurde überraschenderweise gefunden, dass spezielle Mutanten von DNA-Polymerasen der Familie A, nämlich solche, in denen das konservierte C-Motiv und insbesondere dessen QHV-Aminosäuresequenz modifiziert wurde, eine erhöhte Fehlerpaarungs-Diskriminierung aufweisen, und in Nachweisverfahren für Sequenzvarianten einsetzbar sind. Die thermostabilen Varianten hiervon sind zur allel-spezifischen PCR geeignet. Die vorliegende Erfindung betrifft im Einzelnen (1) eine DNA-Polymerase der Familie A, die eine modifizierte Motiv-C-Sequenz und eine, im Vergleich zu der entsprechenden Wildtyppolymerase, erhöhte Fehlerpaarungs-Diskriminierung aufweist, oder ein Klenow-Fragment derselben;

- (2) eine DNA-Sequenz die die DNA-Polymerase oder deren Klenow-Fragment gemäß Ausführungsform (1) codiert;
- (3) ein Vektor, der die DNA-Sequenz gemäß Ausführungsform (2) enthält;
- (4) eine Wirtszelle, die mit dem Vektor gemäß Ausführungsform (3) transformiert ist und/oder eine DNA gemäß Ausführungsform (2) aufweist;
- (5) ein Verfahren zur Herstellung einer DNA-Polymerase oder deren Klenow-Fragment gemäß der Ausführungsform (1), umfassend das Kultivieren einer Wirtszelle Ausführungsform (4) und das Isolieren der DNA-Polymerase oder des Klenow-Fragments aus der Kultur oder dem Kulturüberstand;
- (6) die Verwendung der DNA-Polymerase oder des Klenow-Fragments gemäß Ausführungsform (1) in diagnostischen und molekularbiologischen Verfahren, einschließlich allel-spezifischer PCR, DNA-Amplifikation mittels PCR, Klonierung usw.;
- (7) ein Verfahren zur Bestimmung der An- oder Abwesenheit von mindestens einer Sequenzvariante in einer oder mehreren Target-Nukleinsäuren in einer individuellen Probe unter Verwendung einer DNA-Polymerase gemäß der Ausführungsform (1); und
- (8) ein Kit zur Bestimmung der An- oder Abwesenheit von mindestens einer Sequenzvariante in einer oder mehreren Target-Nukleinsäuren in einer individuellen Probe gemäß des Verfahrens nach Ausführungsform (7) enthaltend wenigstens eine DNA-Polymerase gemäß Ausführungsform (1).

Kurzbeschreibung der Figuren

Figur 1: Autoradiogramme nach denaturierender PAGE zur Untersuchung des Einflusses von Mutationen in *E. coli* DNA-Polymerase I (Klenow-Fragment, 5'→3'-Exonuklease-defizient) in Positionen 879-881 (SEQ ID NO: 2) auf die Selektivität der Primerverlängerung. Reaktionen enthielten 150 nM Primer-/Matrizen-Komplex (Primer: 5'-ACA AAA TAC CTG TAT TCC TX-3', X= A, G, C oder T (SEQ ID NO:11); Matrize: 5'-GA TCC CTG GAC AGG CYA GGA ATA CAG GTA TTT TGT-3', Y= A, G, C oder T (SEQ ID NO:12), 1 mM jeweils dATP, dCTP, TTP, dGTP und 600 nM DNA-Polymerase. Inkubation bei 37°C für 10 min in Puffer (50 mM Tris-HCl pH 7.3, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 0.05% Triton® X-100).

Figur 2: Autoradiogramme nach denaturierender PAGE zur Untersuchung des Einflusses von Mutationen in *E. coli* DNA-Polymerase I (Klenow-Fragment, 5'→3'-

Exonuklease-defizient) in Positionen 879-881 (bezogen auf das in SEQ ID NO:2 gezeigte Klenow-Fragment aus *E. coli*) auf die Selektivität der Primerverlängerung. Reaktionen enthielten 150 nM Primer-/Matrizen-Komplex [a: Primer: 5'-GAC CCA CTC CAT CGA GAT TTC T-3' (SEQ ID NO:14); Matrizen: 5'-GGT CTA GCT ACA GXG AAA TCT CGA TGG AGT GGG TC-3', X = A oder T (SEQ ID NO:15); b: Primer: 5'-GTT TTA GAT GTT AAA TCA CAC TTA T-3' (SEQ ID NO:15); Matrize: 5'-CTT TCC AGA CAA CXT AAG TGT GAT TTA ACA TCT AAA AC-3', X = A oder G (SEQ ID NO:16)], 1 mM jeweils dATP, dCTP, TTP, dGTP und 600 nM DNA-Polymerase. Inkubation bei 37°C für 10 min in Puffer (50mM Tris-HCl pH 7.3, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 0.05% Triton® X-100).

Figur 3: Autoradiogramme nach denaturierender PAGE zur Untersuchung des Einflusses von Mutationen in QVH - Motiv in Taq DNA-Polymerase I auf die Selektivität der Primerverlängerung. Reaktionen enthielten 150 nM Primer-/Matrizen-Komplex [a: Primer: 5'-ACA AAA TAC CTG TAT TCC TX-3', X= T (SEQ ID NO:11); Matrize: 5'-GA TCC CTG GAC AGG CYA GGA ATA CAG GTA TTT TGT-3', Y = A oder G (SEQ ID NO:12); b: Primer: 5'-GAC CCA CTC CAT CGA GAT TTC T-3' (SEQ ID NO:13); Matrize: 5'-GGT CTA GCT ACA GXG AAA TCT CGA TGG AGT GGG TC-3', X = A oder T (SEQ ID NO:14); c: Primer: 5'-GTT TTA GAT GTT AAA TCA CAC TTA T-3' (SEQ ID NO:15); Matrize: 5'-CTT TCC AGA CAA CXT AAG TGT GAT TTA ACA TCT AAA AC-3', X = A oder G (SEQ ID NO:16)], 1mM jeweils dATP, dCTP, TTP, dGTP und 0.6 ng DNA-Polymerase. Inkubation bei 37 °C für 10 min in Puffer (50 mM Tris-HCl (pH 9.2 bei 25°C), 16 mM Ammoniumsulfat, 2.5 mM MgCl₂, 0.1 % Tween® 20).

Figur 4: Real-time PCR Experimente mit Taq (wt) (SEQ ID NO:4) und LVL-Mutante (SEQ ID NO:4 mit LVL in Positionen 782 – 784). Die Experimente wurden mittels einem *iCycler (BIORAD)* System durchgeführt. Typische Reaktion in 20 µl enthielt: 40 pM der betreffenden Matrize in *Taq* DNA-Polymerase Puffer (50 mM Tris-HCl (pH 9.2 bei 25°C), 16 mM Ammoniumsulfat, 2.5 mM MgCl₂, 0.1 % Tween® 20, 0.3 mM dNTPs) 0.5 µM der beiden Primer und 95 ng *Taq* DNA-Polymerase und eine 1/50.000 von *SybrGreen I* 10.000x-Lösung in DMSO (*Molecular Probes*). Die PCR wurde mit folgendem Programm Zyklen bei 95°C für 30 s, 55°C für 35 s und 72°C für 40 s. Reaktionen 1w, 2w, 3w und 4w wurden mit dem

Wildtyp-Enzym, 1m, 2m, 3m und 4m mit der LVL-Mutante durchgeführt. DNA-Sequenzen:

a: Primersonde: 5'-d(GAC CCA CTC CAT CGA GAT TTC T) (SEQ ID NO:19); Reverse Primer: 5'-d(AGA GGA AAG ATG AAG TAC TAT G) (SEQ ID NO:20); Matrize: 5'-d(CAA CTG TTC AAA CTG ATG GGA CCC ACT CCA TCG AGA TTT C_XC TGT AGC TAG ACC AAA ATC ACC TAT TTT TAC TGT GAG GTC TTC ATG AAG AAA TAT ATC TGA GGT GTA GTA AGT AAA GGA AAA CAG TAG ATC TCA TTT TCC TAT CAG AGC AAG CAT TAT GAA GAG TTT AGG TAA GAG ATC TAA TTT CTA TAA TTC TGT AAT ATA ATA TTC TTT AAA ACA TAG TAC TTC ATC TTT CCT CT), X= A (wildtyp)(1) oder T (Mutante)(2) (SEQ ID NO:21).

b: Primersonde: 5'-d(GTT TTA GAT GT TAA ATC ACA CTT AT) (SEQ ID NO:22); Reverse Primer: 5'-d(AAA GCT CCT TTC TGA ATA TTG AG) (SEQ ID NO:23); Matrize: 5'-d(AAA ATG TGA GAA GGG ACC TCA TAA AAT ATG TCA TAT GGA AAT GAG CAG ATA ATA AAG ATT ATA GCT TTT CTT TGT CAA AAG GAG ACT CAA TAT CTT TAC TCT TTC ATC AGG ACA TTG TGA CAA ATG TTT CCC CCA GAA TCA TCC GGG GAA CCA CCT CTG GCC CCA TGT ATG GCC CTG GAC AAA GCT CCT TTC TGA ATA TTG AGC TCA TCA GTG AGA AAA CGG CTG CAT ATT GGT GTC AAA GTG TCA CTG AAC TAA AGG CTG ACT TTC CAG ACA AC_X TAA GTG TGA TTT AAC ATC TAA AAC), X= A (wildtyp)(3) oder G (Mutante)(4) (SEQ ID NO:24).

Detaillierte Beschreibung der Erfindung

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind mutierte DNA-Polymerasen der Familie A mit erhöhter Fehlpaarungs-Diskriminierungsfähigkeit, oder Klenow-Fragmente derselben. Die erhöhte Fehlpaarungs-Diskriminierungsfähigkeit - worunter eine hohe Selektivität gemäß der Watson-Crick-Regeln beim Einbau von komplementären Basen, wie auch schon der Anlagerung eines Primers an die Matrize zu verstehen ist, d. h. ein größeres Verlängerungsselektivitätsverhältnis ($F_{match}/F_{mismatch}$) als die entsprechende Ausgangspolymerase (Wildtyp) aufweist (z. B. bestimmt in dem Fluoreszenz-Testsystem gemäß Beispiel 2) - kann durch Mutation einer bestimmten Aminosäuresequenz in natürlichen Enzymen erreicht werden. Die dadurch bedingten Eigenschaften der DNA Polymerasen übertreffen die der "State-of-the-art" Wildtyppolymerasen, wie sie derzeit kommerziell vertrieben werden. Die Erhöhung der Selektivität der Aktivität von DNA-Polymerasen ermöglicht verlässlichere Systeme zum Nachweis von Mutationen oder Polymorphismen, die direkte Diagnose durch allel-specifische PCR ohne nachge-

schaltete zeit- und kostenintensive Aufreinigungs- und Analyseverfahren und hohe Nachhaltigkeit, da keine chemischen modifizierten Primer verwendet werden müssen.

Nachfolgend Definitionen sind auf die gesamte Anmeldung anzuwenden, sind aber nicht limitierend zu verstehen. "DNA-Polymerasen der Familie A" (auch Polymerasen I genannt) sind solche DNA-polymerisierenden Enzyme, die das A-Motiv mit der Sequenz DYSQIELR in ihrem aktiven Zentrum aufweisen. Es zählen dazu auch die hier beschriebenen Enzyme, die Mutationen im C-Motiv aufweisen. Insbesondere zählen zu diesen auch thermostabile DNA Polymerasen, sowie deren Mutanten.

Unter dem Begriff "Klenow-Fragment" wird ein jedes C-terminale Fragment einer DNA Polymerase der Familie A verstanden, das sowohl Polymeraseaktivität wie auch 3'→5' Exonukleaseaktivität (aber keine 5'→3' Exonukleaseaktivität) besitzt.

Unter "Vektoren" im Sinne der vorliegenden Erfindung sind Plasmide, Cosmide, Phagemide, und Viren zu verstehen, die neben einer DNA von Interesse (wobei es sich insbesondere um erfindungsgemäße Sequenzen von DNA Polymerasen aus der Familie A handelt) auch Kontrollelemente, die die Expression der DNA von Interesse steuern, umfassen.

Unter den Begriff "Wirtszellen" fallen sowohl prokaryontische Zellen, wie *E. coli* (insbesondere *E. coli* XI1-blue, DH5α, BI21 (DE3), M15 [pREP4], SG13005 [pREP4], BL21 (DE3) pLysS), *Halomonas elongata*, *Caulobacter sp.*, *Halobacterium halobium* usw., als auch eukaryontische Zellen, wie Hefe- und andere Pilz-Zellen, pflanzliche und tierische Zellen, einschließlich isolierter menschlicher Zellen, die sich in Zellkultur befinden. Des Weiteren werden unter dem Begriff „Wirtszelle“ auch Zellextrakte verstanden, die bei Vorlage einer mRNA diese translatieren können, wie Weizenkeimextrakt (wheat germ extract) als auch Kaninchen Reticulocytenextract (Rabbit reticulocyte extract, (RRL)). Weiterhin werden hier auch *in vitro* Expressionssystem als „Wirtszelle“ verstanden, wie z. B. das T7 Expression System, pBAD Expression System, ThioFusion™ Expression Systems, trc Expression System, PL Expression System, PurePro™ Caulobacter Expression System, Microbiological Media and Media Components, Qiagen pQE Expression System und das Novagen pET Expression System usw.

Ausführungsform (1) der Erfindung betrifft DNA-Polymerasen der Familie A oder deren Klenow-Fragment, die sich von natürlich vorkommenden DNA-Polymerasen dadurch unterscheiden, dass sie eine erhöhte Fehlpaarungsdiskriminierung auf-

weisen, was zu einer erhöhten Selektivität der Enzymaktivität führt. Die erfindungsgemäßen DNA-Polymerasen leiten sich von bakteriellen DNA-Polymerasen, wie Polymerasen von *E. coli*, *Aquifex*, *Borielia*, *bacillus*, *Chlamydia*, *Chlamydomphila*, *chloroflexus*, *Haemophilis*, *Helio bacter*, *Lacococcus*, *Methylobakterium*, *Myocobakterium*, *Rohodothermus*, *Rickettsia*, *Streptococcus*, *Streptomyces*, *Synecchocysts*, *Treponema* usw., insbesondere jedoch auch von Polymerasen thermostabiler Organismen wie *Thermus aquaticus*, *Thermus thermophilus*, *Thermus filiformis*, *Rhodothermus obamensis*, *Bacillus stearothermophilus* usw. ab. Bei den erfindungsgemäßen DNA-Polymerasen oder deren Klenow-Fragmente sind dabei insbesondere in der Motiv-C-Sequenz QVH in Positionen 879 – 881 (in Bezug auf das in SEQ ID NO:2 gezeigte Klenow-Fragment der DNA-Polymerase aus *E. coli*) wenigstens ein Aminosäurerest, vorzugsweise das Q und/oder das H, durch einen lipophilen Aminosäurerest ersetzt.

"Lipophile Aminosäurereste" im Sinne der vorliegenden Erfindung umfassen die Aminosäurereste Gly, Ala, Val, Leu, Met, Phe, Trp, Ile, Pro usw. Bevorzugte Reste sind dabei Gly, Ala, Val, Leu und Ile. Im Sinne der vorliegenden Erfindung ist die Motiv-C-Sequenz QVH vorzugsweise durch die Sequenzen LVL, LVG, QVL, PIL, QVV, LVA, LAA, LVV, LVI, IVI, III, VVV, QVV, QVA usw. ersetzt, wobei ein Austausch durch LVL und LVG besonders bevorzugt ist.

Neben dem vorstehend genannten Austausch kann die erfindungsgemäße Polymerase noch weitere Mutationen wie z. B. Deletionen, Substitutionen und/oder Additionen (jeweils bis zu 20 Aminosäureresten) aufweisen, vorausgesetzt dass dadurch das größere Verlängerungsverhältnis ($F_{match}/F_{mismatch}$), bezogen auf den Wildtyp, nicht beeinträchtigt wird. Zu den Substitutionen zählen dabei insbesondere weitere (vorzugsweise konservative) Austausche in der Motiv-C-Sequenz, die neben dem oben aufgeführten Ersetzen wenigstens eines Restes in QVH durch einen lipophilen Aminosäurerest erfolgen. So umfasst die vorliegende Erfindung insbesondere auch solche DNA-Polymerasen, die eine Aminosäuresequenz LVN, LYH, PLQ, LVQ, QDL, QEL, QUV usw. an der Stelle von QVH im C-Motiv enthalten.

Darüber hinaus wurde gefunden, dass auch eine DNA-Polymerase mit der Sequenz QVN anstelle von QVH im C-Motiv ein größeres Verlängerungsverhältnis ($F_{match}/F_{mismatch}$), bezogen auf den Wildtyp, aufweist.

Weiterhin beinhaltet die Erfindung eine Taq-Polymerase deren QVH Sequenz wie vorstehend beschrieben ausgetauscht wurde. Besonders bevorzugt sind dabei solche Taq-Polymerase deren QVH Sequenz durch LVL oder LVG ausgetauscht wurden (in Bezug auf die in SEQ ID NO:4 gezeigte Taq Polymerase Proteinsequenz sind die Positionen 782-784 vom Austausch betroffen).

Bei den erfindungsgemäßen Klenow-Fragmenten ist es bevorzugt, dass wenigstens zwei Aminosäurereste in QVH durch lipophile Aminosäurereste ersetzt sind. Besonders bevorzugt unter den vorstehend genannten Sequenzen mit zwei Austauschen sind – auch für die Klenow-Fragmente - LVL und LVG.

Die Aminosäuresequenz der erfindungsgemäßen DNA-Polymerasen wurde somit an einer oder mehreren Stellen verändert im Vergleich zu den DNA-Wildtyppolymerasen, und dies spiegelt sich auch auf Nukleinsäureebene wieder. Erfindungsgegenstand ist auch eine DNA Sequenz, die für eine der erfindungsgemäßen DNA-Polymerasen oder deren Klenow-Fragment codiert (Ausführungsform (2) der Erfindung). Ebenso ist ein Vektor, der die DNA-Polymerase (1) codierende DNA Sequenz enthält, sowie eine Wirtszelle, die mit einem Vektor transformiert ist, der die DNA-Polymerase (1) codierende DNA Sequenz enthält, und/oder die eine die DNA-Polymerase (1) codierende DNA aufweist, Gegenstand der Erfindung. Ebenfalls Erfindungsgegenstand ist ein Verfahren zur Herstellung einer DNA-Polymerase oder deren Klenow-Fragment, welches das Kultivieren der transformierten Wirtszelle und das Isolieren der DNA-Polymerase oder des Klenow-Fragments aus der Kultur oder dem Kulturüberstand umfasst.

Thermostabile DNA-Polymerasen gemäß Ausführungsform (1) der Erfindung haben eine höhere Selektivität in der Polymerase Kettenreaktion (PCR) und diskriminieren besser zwischen einzelnen Fehlpaarungen und kanonischen Komplexen als natürlich vorkommende DNA-Polymerasen. Dies bedingt verbesserte Eigenschaften der Mutanten im Einsatz von diagnostischen (Allel-spezifische PCR) und molekularbiologischen (DNA-Amplifikation mittels PCR, Klonierung) Verfahren. Verfahren in denen die erfindungsgemäße DNA-Polymerase oder deren Klenow-Fragment eingesetzt werden kann, sind daher ebenfalls Gegenstand der Erfindung.

Die DNA-Polymerase gemäß Ausführungsform (1) der Erfindung ist auch in einem Verfahren zur Bestimmung der An- oder Abwesenheit von Sequenzvarianten in einer oder mehreren Target-Nukleinsäuren in einer individuellen Probe einsetzbar (Ausführungsform (7)). Solch ein Verfahren umfasst vorzugsweise einen oder mehrere der folgenden Schritte:

- a) Zugabe von
 - Desoxy-Nukleosid-Triphosphaten,
 - einer der erfindungsgemäßen DNA-Polymerasen
 - mindestens einem diskriminierenden Primer, enthaltend mindestens einen diskriminierenden Nukleotidrest, wobei für jede nachzuweisende Sequenzvariante einer Target-Nukleinsäure ein Primer zugegeben wird, welcher eine Sequenz komplementär zur nachzuweisenden Sequenzvariante aufweist, und wobei die nachzuweisende Sequenzvariante in der Target-Nukleinsäure komplementär zu mindestens einem 3' terminalen-, 3' proximalen-, oder 3' proxim-proximalen Nukleotidrest des diskriminierenden Primers ist,
 - mindestens einem weiteren Primer, der komplementär zu einem Primer-Extensionsprodukt, entstehend durch Extension eines diskriminierenden Primers ist
- b) Durchführung einer Primer-Extensionsreaktion, wobei ein Verlängerungsprodukt des diskriminierenden Primers im Wesentlichen nur dann erhalten wird, wenn die Probe eine Target-Nukleinsäure mit der nachzuweisenden Sequenzvariante enthält
- c) Trennung des Produkts der Primer-Extensionsreaktion von der Template Nukleinsäure
- d) Zyklische Wiederholung der Schritte b) und c) zum Erhalt eines Amplifikationsproduktes, beispielsweise durch Polymerase-Kettenreaktion
- e) Bestimmung der An- oder Abwesenheit einer Sequenzvariante aufgrund der An- oder Abwesenheit des Amplifikationsproduktes.

In diesem Zusammenhang sind die für die Beschreibung des erfindungsgemäßen Verfahrens verwendeten Begriffe wie folgt zu verstehen:

Eine "erfindungsgemäße DNA Polymerase" ist dabei eine wie vorstehend definierte DNA-Polymerase der Familie A, die das A-Motiv mit der Sequenz DYSQIELR in ihrem aktiven Zentrum aufweist und bestimmte Mutationen im C-

Motiv besitzt. Insbesondere zählen zu diesen auch thermostabile DNA Polymerasen mit Mutationen im C-Motiv. Bei den Mutationen handelt es sich um konservative Substitutionen der QVL Aminosäurereste des C-Motivs und/oder die vorstehend definierten nicht-konservierende Substitutionen.

Eine "thermostabile DNA Polymerase" ist eine Polymerase die auch bei Temperaturen von über 42°C funktionsfähig ist, und insbesondere bei auf PCR basierenden Amplifikationsverfahren eingesetzt werden kann.

Insbesondere fallen unter dem Begriff „Extensionsreaktionen“ Reaktionsgemische die wenigstens eine Polymerase, Nukleotide, eine Matrize(n) und Primer umfassen. Die Reaktionsbedingungen sind so gewählt, dass der/die Primer sich an die Matrize anlagern kann/können, und die Polymerase die Verlängerung des/der Primers durch Einbau von matrizenkomplementären Nukleotiden katalisiert. Als Produkt entsteht ein Primerextensionsprodukt.

Eine "Target-Nukleinsäure" ist ein Nukleinsäure-Abschnitt aus einer biologischen Probe, deren Sequenz mit Hilfe des erfindungsgemäßen Verfahrens näher analysiert werden soll. Die biologische Probe besteht dabei in der Regel aus genomicscher DNA. Ebensogut ist das erfindungsgemäße Verfahren jedoch für die Analyse von RNA-Sequenzvarianten geeignet (?). Es ist dabei unerheblich, ob die Probe aus zellulärem Material oder biologischen Flüssigkeiten wie Blut, Serum, Plasma, Urin oder Speichel isoliert wurde.

Unter einer "Sequenzvariante" im Sinne der Erfindung ist eine Target-Nukleinsäure mit einer bestimmten Nukleinsäure-Sequenz zu verstehen, die sich von Sequenzen anderer möglicher Target Nukleinsäuren nur minimal unterscheidet, und bedingt durch diese minimalen Unterschiede identifizierbar ist. Dabei betreffen die Sequenzunterschiede vorzugsweise zwischen ein und drei aufeinander folgende Nukleotidreste. Besonders geeignet ist die vorliegende Erfindung zur Identifikation von Sequenzvarianten betreffend nur einem einzelnen Nukleotidrest (SNP). Dabei kann es sich sowohl um einen Basenaustausch, aber alternativ auch um Nukleotidadditionen bzw. -deletionen handeln. Auf diese Art können verschiedene Allele voneinander unterschieden werden. Punktmutationen oder Polymorphismen können so ebenfalls nachgewiesen werden. Unter einer Sequenzvariante werden somit insbesondere auch Punktmutationen oder Polymorphismen verstanden, die im Hinblick auf prognostische oder diagnostische Fragestellungen analysiert werden.

Bei einer Matrizen-abhängigen Polymerisation von Desoxynukleotid-triphosphaten erfolgt beginnend am 3'-Ende eines sogenannten Primers, welcher an eine einzelsträngige Template-Nukleinsäure hybridisiert ist, eine Polymerisation der Desoxynukleotidtriphosphate in der Weise, dass eine zur Target-Nukleinsäure komplementäre Sequenz entsteht. Derartige Polymerisationsreaktionen in 5'-3'-Orientierung werden vorzugsweise enzymatisch mit sog. DNA-Polymerasen, wie beispielsweise Klenow Polymerase, durchgeführt. Besonders bevorzugt sind thermostabile DNA-Polymerasen, wie z.B. Taq-Polymerase (Roche Applied Science Katalog Nr. 1146165).

Ein "diskriminierender Primer" im Sinne der Erfindung ist ein Primer, dessen Sequenz exakt komplementär zu einer bestimmten Sequenzvariante ist, wobei diese Sequenz bestimmte Unterschiede zu einer anderen Sequenzvariante aufweist, welche sich in der zu analysierenden Probe befinden kann. Als "diskriminierender Nukleotidrest" wird in diesem Zusammenhang ein Nukleotidrest verstanden, dessen Komplement in den verschiedenen existierenden Sequenzvarianten von unterschiedlichen Nukleotidresten gebildet wird.

Der "3'-terminale Nukleotidrest" ist derjenige Nukleotidrest, der sich an dem terminalen Ende eines Oligonukleotidprimers befindet, das eine freie 3'-OH-Gruppe besitzt. Der "proxy-terminale Nukleotidrest" ist derjenige Nukleotidrest eines Oligonukleotidprimers, dessen Ende über eine Phosphatgruppe mit dem 5'-Ende des terminalen Nukleotidrestes verbunden ist. Als proxy-proxy-terminaler Nukleotidrest wird derjenige Nukleotidrest bezeichnet, dessen 3'-Ende über eine Phosphatgruppe mit dem 5'-Ende des proxy-terminalen Nukleotidrests verknüpft ist.

Wie aus der oben stehenden Beschreibung des erfindungsgemäßen Verfahrens hervorgeht, handelt es sich bei den Schritten a)-e) im Wesentlichen um eine Amplifikationsreaktion, die abhängig von der An- oder Abwesenheit einer bestimmten Sequenzreaktion zu einem Amplifikationsprodukt führt. Derartige Verfahren können deshalb nach aus dem Stand der Technik bekannten Protokollen für PCR-Reaktionen durchgeführt werden.

Gegenstand der Erfindung ist in diesem Zusammenhang auch ein Kit, enthaltend Mittel zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens. Ein derartiger Kit enthält insbesondere eine erfindungsgemäße DNA-Polymerase. Wahlweise kann ein derartiger Kit zusätzliche Komponenten enthalten wie beispielsweise einen

oder mehrere (diskriminierende) Primer, Desoxynukleotidtriphosphat, Puffer, Quantifizierungsreagenzien, insbesondere interkalierende Reagenzien oder in der kleinen Furche anbindendende Reagenzien, wobei besonders bevorzugt Reagenzien aus der Gruppe von PicoGreen (Molecular Probes), SybrGreen (Molecular Probes), Ethidiumbromid, Gelstar (Cambrex), Vista Green (Amesham) ausgewählt werden, Polymerase-blockierende Antikörper, insbesondere TaqBlock, sowie Mittel zur Template-abhängigen Polymerisation der Desoxynukleotidtriphosphate. Die einzelnen Komponenten des Kits können in verschiedenen Ausführungsformen wahlweise in einem Aufbewahrungsgefäß zusammen bzw. in zwei oder mehreren Aufbewahrungsgefäßen getrennt enthalten sein.

Wie aus den weiter unten aufgeführten Beispielen hervorgeht, sind die beobachteten Effekte hinsichtlich der Verbesserung der Spezifität gegenüber aus dem Stand der Technik verfügbaren Verfahren quantitativ eindeutig belegbar und führen dazu, dass unter PCR-Amplifikationsbedingungen Extensionsprodukte von Sequenzvarianten-spezifischen Primern in der Tat im Wesentlichen nur dann erhalten werden, wenn die zu analysierende Probe eine Target-Nukleinsäure mit der nachzuweisenden Sequenzvariante enthält. Dieser spezifische Effekt kann durch Verbesserung und Optimierung der jeweiligen PCR-Parameter mit Hilfe von dem Fachmann aus dem Stand der Technik bekannten Maßnahmen optimiert und an die jeweils nachzuweisende Sequenzvariante adaptiert werden.

Eine weitere Ausführungsform der vorliegenden Erfindung betrifft die Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens mit Hilfe von Real Time PCR. Bei dieser Methodik werden die Endprodukte der Amplifikationsreaktion nicht gelelektrophoretisch nachgewiesen, sondern der Verlauf der Amplifikationsreaktion wird mit Hilfe von geeigneten Fluoreszenz-markierten Hybridisierungssonden verfolgt, so dass kinetische Echtzeitmessungen und Quantifizierungen möglich sind.

Bei den für die erfindungsgemäßen Verfahren einzusetzenden Hybridisationssonden handelt es sich in der Regel um einzelsträngige Nukleinsäuren wie einzelsträngige DNA oder RNA bzw. deren Derivate oder alternativ auch PNAs, die bei der Annealing Temperatur der Amplifikationsreaktion mit der Target-Nukleinsäure hybridisieren. Üblicherweise haben diese Oligonukleotide eine Länge von 20 bis 100 Nukleotiden.

Die Markierung kann abhängig vom genauen Detektionsformat an jeder beliebigen Ribose- oder Phosphatgruppe des Oligonukleotids eingeführt werden. Bevorzugt sind Markierungen am 5' und 3' Ende des Nukleinsäuremoleküls. Die Art der Markierung muß im Echtzeit-Modus der Amplifikationsreaktion detektierbar sein. Dies ist beispielsweise nicht nur mit Fluoreszenzmarkierungen möglich, sondern alternativ auch mithilfe von Markierungen, die nach dem Prinzip der NMR detektierbar sind.

Dabei sind viele verschiedene Testführungen möglich. Als besonders geeignet in Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung haben sich die folgenden drei Detektionsformate erwiesen:

1. FRET-Hybridisationssonden: Für dieses Testformat werden 2 einzelsträngige Hybridisationssonden gleichzeitig verwendet, die komplementär zu benachbarten Stellen desselben Strangs der amplifizierten Target-Nukleinsäure sind. Beide Sonden sind mit unterschiedlichen Fluoreszenzkomponenten markiert. Bei Anregung mit Licht einer geeigneten Wellenlänge einer ersten Komponente überträgt diese nach dem Prinzip des Fluoreszenzresonanzenergietransfers die absorbierte Energie auf die zweite Komponente, sodass bei Bindung beider Hybridisationsproben an benachbarte Positionen des nachzuweisenden Target-Moleküls eine Fluoreszenzemission der zweiten Komponente gemessen werden kann. Alternativ können ein Fluoreszenz-markierter Primer und nur eine markierte Oligonukleotidsonde verwendet werden (Bernard et al., Analytical Biochemistry 235, 1001-107 (1998)).

2. TaqMan-Hybridisationssonden: Eine einzelsträngige Hybridisationssonde wird mit 2 Komponenten markiert. Bei Anregung der ersten Komponente mit Licht einer geeigneten Wellenlänge wird nach dem Prinzip des Fluoreszenz-Resonanzenergietransfers die absorbierte Energie auf die zweite Komponente, den sogenannten Quencher übertragen. Während des Annealing-Schrittes der PCR Reaktion bindet die Hybridisationssonde an die Target-DNA und wird während der sich anschließenden Elongationsphase durch die 5'-3' Exonuklease-Aktivität der Taq-Polymerase degradiert. Dadurch werden die angeregte Fluoreszenzkomponente und der Quencher räumlich voneinander getrennt, sodass eine Fluoreszenzemission der ersten Komponente gemessen werden kann.

3. Molecular Beacons: Diese Hybridisationssonden sind ebenfalls mit einer ersten Komponente und einem Quencher markiert, wobei sich die Markierungen vorzugsweise an den beiden Enden der Sonde befinden. In Lösung befinden sich beide Komponenten aufgrund der Sekundärstruktur der Sonde in räumlicher Nähe zueinander. Nach Hybridisierung an die Target-Nukleinsäure werden beide Komponenten von einander getrennt, sodass nach Anregung mit Licht einer geeigneten Wellenlänge die Fluoreszenzemission der ersten Komponente gemessen werden kann (Lizardi et al., US 5,118,801).

In alternativen Ausführungsformen kann das jeweilige Amplifikationsprodukt erfundungsgemäß auch durch einen DNA-Bindefarbstoff nachgewiesen werden, welcher bei Interaktion mit doppelsträngiger Nukleinsäure nach Anregung mit Licht einer geeigneten Wellenlänge ein entsprechendes Fluoreszenzsignal emmitert.

Als besonders geeignet für diese Anwendung haben sich die Farbstoffe SybrGreen und SybrGold (Molecular Probes) erwiesen. Alternativ können auch interkalierende Farbstoffe verwendet werden.

Die Erfindung wird anhand der nachfolgenden Beispiele und Abbildungen näher erläutert. Die beschriebenen Verfahren sind nicht als Einschränkung der Erfindung sondern als Beispiele zu verstehen, die auch noch nach Modifikationen den Gegenstand der Erfindung beschreiben.

Beispiele

Beispiel 1: Aufbau einer Bibliothek und Reinigung von Klenow-Fragment-Varianten

Das Plasmid pQKF⁺ (Brakman, S., Nieckchen, P., ChemBioChem 2001, 2, 773-7; siehe auch das in SEQ ID NO:26 gezeigte äquivalente Plasmid pQE30) ermöglicht die Expression des N-terminalen 6-His-markierten Klenow-Fragments von *E.-coli*-DNA-Polymerase I (3'-5' exo⁻) unter der Kontrolle einer T5-Promotor/Doppel-lac-Operator-Sequenz. Die Einführung von Mutationen in die Motiv-c-Sequenz, die für Q879, V880 and H881 codiert, erfolgte durch eine zweistufige Megaprimer-Mutagenese. PCR-Reaktionen wurden unter Verwendung von PfuTurbo-DNA-Polymerase (Stratagene) und unter Standardbedingungen durchgeführt. Die erste PCR wurde mit einer dotierten Primerbibliothek durchgeführt (5'-GTA CGT ATG ATC ATG NNN NNN GAT GAA CTG GTA TTT-3'; SEQ ID NO:5), die so aufgebaut war, dass sie 40% Nichtwildtyp-Nucleotid auf jeder der neun Zielpositionen und einen 23mer-Downstream-Primer (5'-GCT AAT TAA GCT TGG CTG

CAG GC-3'; SEQ ID NO:6) enthielt, was ein 195mer-PCR-Produkt ergab. Die zweite PCR wurde unter Verwendung des Agarose-Gel-gereinigten 195mers und eines 24mer-Antisense-Primers (5'-TAC ATG GAC CTT TAC TTC GAA CGC-3' SEQ ID NO:7) durchgeführt und ergab ein 457-bp-Produkt, das mit Csp45I und HindIII verdaut und in pQKF einkloniert wurde. Die resultierende Plasmidbibliothek wurde in *E.-coli*-XL-1blue (Stratagene) transformiert, Klone wurden aus Agarplatten herausgesucht und getrennt über Nacht in 96-Napf-Platten gezüchtet, die Superbroth-Medium (100 µg/ml Ampicillin) enthielten. Klenow-Fragment-Varianten wurden parallel in 600-µl-Kulturen exprimiert, geerntet und lysiert, wobei man 96-Napf-Platten verwendete, wie es beschrieben ist. Die erhaltenen 300-µl-Lysate wurden mit 900 µl Aufbewahrungspuffer (50mM Tris-HCl pH 7.3, 1 mM DTT, 0.1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1 mM Benzamidin, 1 µg/ml Leupeptin und 1 µg/ml Aprotinin) verdünnt, zentrifugiert und bei -80 °C aufbewahrt.

Für Primerverlängerungsreaktionen und kinetische Messungen im stationären Zustand wurden Klenow-Fragment und ausgesuchte Mutanten exprimiert, wie es oben beschrieben ist, und unter Verwendung von Ni-NTA-Agarose (Qiagen) gereinigt, wobei die Vorschriften des Herstellers befolgt wurden, aber das Imidazol im Lyse- und Waschschritt weggelassen wurde. Die erhaltenen Enzyme waren >95% rein, was durch SDS PAGE mit Coomassie-Blau-Färbung bestätigt wurde. Nach Austausch des Puffers (gegen 100 mM K₂HPO₄, 1 mM DTT pH 6.5 mit 50% Glycerin) wurden Konzentrationen unter Verwendung des Nanoorange-Assays (Molecular Probes) gemessen und auf 1 µg/µl eingestellt.

Beispiel 2: Durchmusterung (Screening)

Die Reaktionsgemische für die Durchmusterung der Bibliothek enthielten 150 nM Matrize, 225 nM Primer, 50 mM Tris-HCl pH 7.3, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 0.05% Triton X-100 und jeweils 200 µM dNTP. Die Reaktionen umfassten den 20mer-Primer FVL20TH (5'-ACA AAA TAC CTG TAT TCC TT-3'; SEQ ID NO:8), der so gestaltet ist, dass er mit der 3'-terminalen Base an das humane SNP G1691A bindet, das an der Faktor-V-Leiden-Mutation beteiligt ist. Für Messungen von Paarungsverlängerungseffizienzen wurde die 90mer-Matrize TFVL90A (5'-GAC ATC ATG AGA GAC ATC GCC TCT GGG CTA ATA GGA CTA CTT CTA ATC TGT AAG AGC AGA TCC CTG GAC AGG CAA GGA ATA CAG GTA TTT-3'; SEQ ID NO:9), die für das mutante Allel 1691A des humanen Faktor-V-ORF codiert, verwendet, was zu einem TA-Basenpaar am 3'-Terminus des Primers führte. Um Zugang zu Aktivitäten von Klenow-Varianten zu erhalten, die einen fehlgepaarten

Primerterminus prozessieren, wurde die 90mer-Matze TFVL90G (5'-GAC ATC ATG AGA GAC ATC GCC TCT GGG CTA ATA GGA CTA CTT CTA ATC TGT AAG AGC AGA TCC CTG GAC AGG CGA GGA ATA CAG GTA TTT-3'; SEQ ID NO:10) verwendet, die für das entsprechende Wildtyp-Allel 1691G codiert, was zu einer TG-Fehlpaarung am 3'-Primerterminus führte. Beide Reaktionen wurden für jedes Element der Bibliothek parallel durchgeführt, um eine Bewertung der Aktivitätsverhältnisse als Verlängerungsselektivitäten zu ermöglichen. 10 µl der Reaktionsgemische wurden in schwarze 384-Napf-Platten ausgegeben, die auf 37 °C vorgewärmt wurden, wobei man eine automatische Flüssigkeitshandhabungsvorrichtung (Hamilton Microlab Star) verwendete, und anschließend wurden 5 µl Lysatlösung hinzugefügt. Nach 10 min wurden die Reaktionen durch Zugabe von 30 µl Stopplösung (50 mM Tris-HCl pH 7.3, 100 mM NaCl, 10 mM EDTA) abgebrochen, die 3.4x SYBRGrün I (Molecular Probes) für die Quantifizierung der von Klenow-Varianten erzeugten dsDNA enthielt. Die Fluoreszenzintensitäten wurden mit Hilfe eines Fluoreszenzplatten-Lesegeräts (Polarstar Optima, BMG Labtechnologies GmbH) mit Anregung bei 485 nm und Emission bei 520 nm quantifiziert. Die Verhältnisse der gemessenen Fluoreszenzintensitäten ($F_{match}/F_{mismatch}$, willkürliche Einheiten) wurden zur Bestimmung der Verlängerungsselektivität herangezogen. Alle DNA-Polymerasen mit größerem Verlängerungsselektivitätsverhältnis ($F_{match}/F_{mismatch}$) als der Wildtyp wurden als Enzyme identifiziert, die eine erhöhte Verlängerungsselektivität besitzen.

Beispiel 3: Primerverlängerungsassays

Primer-Matzensubstrate wurden assoziiert, indem man 5'-³²P-markierten Primer im spezifischen Reaktionspuffer (50 mM Tris-HCl pH 7.3, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 0.05% Triton® X-100) mit der doppelten Menge Matze mischte. Das Gemisch wurde 5 min lang auf 95 °C erhitzt und anschließend über 1 h auf Raumtemperatur abkühlen gelassen. Nach der Assoziation wurden dNTP hinzugefügt, und die Lösung wurde 5 min lang bei 37 °C inkubiert. 15 µl Reaktionen wurden durch Zugabe von 5 µl Enzymlösung in 1x Reaktionspuffer zu 10 µl Assoziationsmischung eingeleitet, und es wurde 10 min lang bei 37 °C inkubiert. Die Assays beinhalteten 150 nM Primer, 225 nM Matze, jeweils 1 mM dNTP und 590 nM Enzym in geeignetem Reaktionspuffer. Nach 10 min Inkubation wurden die Reaktionen durch Zugabe von 30 µl Gelbeladungspuffer (80% Formamid, EDTA, 20 mM) abgebrochen, und die Produktgemische wurden durch 14% de-

naturierendes PAGE analysiert (siehe Fig. 1 und 2). Die folgenden Primer- und Matrizensequenzen wurden im Zusammenhang mit verschiedenen SNPs (Positionen unterstrichen) eingesetzt:

Humane genomische Factor-V-Leiden-DNA-Sequenz: Primer: 5'-ACA AAA TAC CTG TAT TCC TT-3' (SEQ ID NO:11), Wildtypmatrize: 5'-GAT CCC TGG ACA GGC GAG GAA TAC AGG TAT TTT GT-3' (SEQ ID NO:12), mutante Matrize: 5'-GAT CCC TGG ACA GGC AAG GAA TAC AGG TAT TTT GT-3' (SEQ ID NO:12).

Humane somatische BRAF-T1796A-Mutation: Primer: 5'-GAC CCA CTC CAT CGA GAT TTC T-3' (SEQ ID NO:13), Wildtypmatrize: 5'-GGT CTA GCT ACA GTG AAA TCT CGA TGG AGT GGG TC-3' (SEQ ID NO:14), mutante Matrize: 5'-GGT CTA GCT ACA GAG AAA TCT CGA TGG AGT GGG TC-3' (SEQ ID NO:14).

Humane Dihydropyrimidin-Dehydrogenase (DPyD) Mutation G735A: Primer: 5'-GTT TTA GAT GTT AAA TCA CAC TTA T-3' (SEQ ID NO:15), Wildtypmatrize: 5'-CTT TCC AGA CAA CGT AAG TGT GAT TTA ACA TCT AAA AC-3' (SEQ ID NO:16), mutante Matrize: 5'-CTT TCC AGA CAA CAT AAG TGT GAT TTA ACA TCT AAA AC-3' (SEQ ID NO:16).

Humane saure Ceramidase Mutation A107G: Primer: 5'-CGT TGG TCC TGA AGG AGG AT-3' (SEQ ID NO:17), Wildtypmatrize: 5'-AAA TCA ACC TAT CCT CCT TCA GGA CCA ACG TAC-3' (SEQ ID NO:18), mutante Matrize: 5'-AAA TCA ACC TGT CCT CCT TCA GGA CCA ACG TAC-3' (SEQ ID NO:18).

Beispiel 4: Klonieren von Taq-DNA-Polymerase

Das Plasmid pTTQ18::*Taq* (SEQ ID NO: 25) wurde von Engelke *et al.* (Anal. Biochem.1990, 191, 396-400 (1990)) konstruiert und ermöglicht die Expression von *Taq*-DNA-Polymerase unter der Kontrolle einer *P_{tac}*-Promotor/*lac*-Operator-Sequenz. Die LVL-Mutation wurde durch PCR in das *Taq*-QVH-Motiv eingeführt, wobei man den QuikChange®-Kit von *Stratagene* verwendete. Das resultierende mutante Plasmid und das Wildtypplasmid wurden in *E.-coli*-XL1-Blue (*Stratagene*) transformiert. Klone wurden herausgesucht und über Nacht in 20 ml Superbroth (100 µg/ml Carbenicillin) gezüchtet. Die Expression der *Taq*-Klone wurde in Kulturen in 1 l Superbroth (100 µg/ml Carbenicillin) durchgeführt, und die Zellen wurden nach 16 h Induktion mit 1 mM IPTG geerntet. Die Reinigung der *Taq*-DNA-Polymerase wurde so durchgeführt, wie es von Engelke *et. al* (Anal. Biochem.1990, 191, 396-400) beschrieben wird. Anstelle der Reinigung durch Ionenaustausch wurde eine Gelfiltration unter Verwendung einer Säule mit

Sephadex®-75 (Amersham) angewendet. Die erhaltenen Enzyme waren zu >90% rein, was durch SDS PAGE mit Coomassie-Blau-Färbung bestätigt wurde. Die Konzentrationen wurden unter Verwendung des Nanoorange-Assays (Molecular Probes) und SDS PAGE mit Coomassie-Blau-Färbung gemessen.

Beispiel 5: Primerverlängerung mit Katalyse durch Taq-DNA-Polymerase
Primer-Matrizensubstrate wurden assoziiert, indem man 5'-³²P-markierten Primer im spezifischen Reaktionspuffer (50 mM Tris-HCl (pH 9.2 bei 25 °C), 16 mM Ammoniumsulfat und 2.5 mM MgCl₂, 0.1 % Tween® 20) mit der doppelten Menge Matrize mischte. Das Gemisch wurde 10 min lang auf 95 °C erhitzt und anschließend über 1 h auf Raumtemperatur abkühlen gelassen. Nach der Assoziation wurden dNTP hinzugefügt, und die Lösung wurde 5 min lang bei 37 °C inkubiert. 15 µl Reaktionen wurden durch Zugabe von 5 µl Enzymlösung in 1x Reaktionspuffer zu 10 µl Assoziationsmischung eingeleitet, und es wurde 10 min lang bei 72 °C inkubiert. Die Assays beinhalteten 150 nM Primer, 225 nM Matrize, jeweils 1 mM dNTP und 0,5 ng Taq-LVL-DNA-Polymerase (mutante Polymerase) und 0.06 ng Taq-DNA-Polymerase in geeignetem Reaktionspuffer. Nach 10 min Inkubation wurden die Reaktionen durch Zugabe von 30 µl Gelbeladungspuffer (80% Formamid, EDTA, 20 mM) abgebrochen, und die Produktgemische wurden durch 14% denaturierendes PAGE analysiert (siehe Figur 3). Bezuglich der Primer- und Matrizensequenzen, die im Zusammenhang mit den SNPs humane genomische Factor-V-Leiden-DNA-Sequenz, humane somatische BRAF-T1796A-Mutation und humane Dihydropyrimidin-Dehydrogenase (DPyD) Mutation G735A verwendet wurden, wird auf Beispiel 3 verwiesen.

Beispiel 6: Echtzeit-PCR-Experimente

Echtzeit-PCR wurde unter Verwendung eines *iCycler*-Systems (BIORAD) durchgeführt. Die Reaktionen wurden in einem Gesamtvolumen von 20 µl durchgeführt, das 4 pM der jeweiligen Matrizen in Taq-DNA-Polymerase-Puffer (50 mM Tris-HCl (pH 9.2 bei 25 °C), 16 mM Ammoniumsulfat und 2.5 mM MgCl₂, 0.1 % Tween 20) enthielt. Die endgültigen Gemische enthielten dNTPs (jeweils 200 µM dATP, dGTP, dCTP und TTP), Primer (jeweils 0.5 µM der jeweiligen Primersonde und des umgekehrten Primers) und 13 ng Taq-DNA-Polymerase (SEQ ID NO:4), 95 ng DNA-Polymerase von Taq-LVL-Mutante (SEQ ID NO:4 mit LVL in Positionen 782 – 784) und eine wässrige 1/50.000-Verdünnung einer 10.000fachen Lösung

von *SybrGreen I* in DMSO (*Molecular Probes*). Alle PCR-Amplifikationen wurden unter Verwendung des folgenden Programms durchgeführt: Anfangsdenaturierung bei 95 °C während 3 min, dann 40 Cyclen Denaturierung bei 95 °C während 30 s, Primerassoziation bei 55 °C während 35 s und Verlängerung bei 72 °C während 40 s. Die vorgestellten Ergebnisse stammen von wenigstens dreimal wiederholten unabhängigen Messungen an drei Parallelansätzen, die aus einer Stammmischung hervorgingen. Die Ergebnisse sind in Figur 4 zusammengefasst. Die folgenden DNA-Sequenzen wurden eingesetzt:

Sequenzen im BRAF-Zusammenhang: Primersonde BrafT: 5'-d(GAC CCA CTC CAT CGA GAT TTC T) (SEQ ID NO:19), umgekehrter Primer: 5'-d(AGA GGA AAG ATG AAG TAC TAT G) (SEQ ID NO:20), Zielmatrize BrafX: 5'-d(CAA CTG TTC AAA CTG ATG GGA CCC ACT CCA TCG AGA TTT C_XC TGT AGC TAG ACC AAA ATC ACC TAT TTT TAC TGT GAG GTC TTC ATG AAG AAA TAT ATC TGA GGT GTA GTA AGT AAA GGA AAA CAG TAG ATC TCA TTT TCC TAT CAG AGC AAG CAT TAT GAA GAG TTT AGG TAA GAG ATC TAA TTT CTA TAA TTC TGT AAT ATA ATA TTC TTT AAA ACA TAG TAC TTC ATC TTT CCT CT), X= A BrafA, X= T, BrafT (SEQ ID NO:21).

Sequenzen im DPyD-Zusammenhang: Primersonde DpyDT: 5'-d(GTT TTA GAT GT TAA ATC ACA CTT AT) (SEQ ID NO:22), umgekehrter Primer: (5'-d(AAA GCT CCT TTC TGA ATA TTG AG) (SEQ ID NO:23), Zielmatrize DPyDX: 5'-d(AAA ATG TGA GAA GGG ACC TCA TAA AAT ATG TCA TAT GGA AAT GAG CAG ATA ATA AAG ATT ATA GCT TTT CTT TGT CAA AAG GAG ACT CAA TAT CTT TAC TCT TTC ATC AGG ACA TTG TGA CAA ATG TTT CCC CCA GAA TCA TCC GGG GAA CCA CCT CTG GCC CCA TGT ATG GCC CTG GAC AAA GCT CCT TTC TGA ATA TTG AGC TCA TCA GTG AGA AAA CGG CTG CAT ATT GGT GTC AAA GTG TCA CTG AAC TAA AGG CTG ACT TTC CAG ACA AC_X TAA GTG TGA TTT AAC ATC TAA AAC), X= A DpyDA, X= T, DpyDG (SEQ ID NO:24). Die Oligonucleotide BrafX und DpyDX (SEQ ID NO:21 und 24) wurden von IBA, Göttingen, synthetisiert und gereinigt.

Patentansprüche

1. Eine DNA-Polymerase der Familie A, die eine modifizierte Motiv-C-Sequenz und eine, im Vergleich zu der entsprechenden Wildtyppolymerase, erhöhte Fehlpaarungs-Diskriminierung aufweist oder ein Klenow-Fragment derselben.
2. Die DNA-Polymerase oder deren Klenow-Fragment nach Anspruch 1, die eine bakterielle DNA-Polymerase, vorzugsweise eine thermostabile DNA-Polymerase ist, besonders bevorzugt ausgewählt aus der Gruppe von Polymerasen von *Thermus thermophilus*, *Thermus filiformis*, *Rhodothermus obamensis* oder *Bacillus stearothermophilus*.
3. Die DNA-Polymerase oder deren Klenow-Fragment nach Anspruch 1 oder 2, wobei in der Motiv-c-Sequenz QVH in Position 879-881, bezogen auf das in SEQ ID NO: 2 gezeigte Klenow-Fragment der *E. coli* DNA-Polymerase, wenigstens ein Aminosäurerest, vorzugsweise Q879 und/oder H881 durch einen lipophilen Aminosäurerest ersetzt wurde.
4. Die DNA-Polymerase oder deren Klenow-Fragment nach Anspruch 3, wobei der lipophile Aminosäurerest ausgewählt ist aus Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met und Trp, vorzugsweise ausgewählt ist aus Gly, Ala, Val, Leu und Ile und besonders bevorzugt die Motiv-C-Sequenz QVH ersetzt ist durch die Sequenzen LVL oder LVG.
5. Die DNA-Polymerase oder deren Klenow-Fragment nach Anspruch 3,
 - (i) die eine Taq-Polymerase mit der in SEQ ID NO:4 gezeigten Sequenz ist, in der die Sequenz QVH in Position 782-784 durch LVL oder LVG ersetzt ist oder
 - (ii) die ein Klenow-Fragment mit der in SEQ ID NO:2 gezeigten Sequenz ist, in der die Sequenz QVH in Position 879-881 durch LVL oder LVG ersetzt ist.
6. Eine DNA-Sequenz die für eine DNA-Polymerase oder deren Klenow-Fragment gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 5 codiert.

7. Ein Vektor, der die DNA-Sequenz gemäß Anspruch 6 enthält.
8. Eine Wirtszelle, die mit dem Vektor gemäß Anspruch 7 transformiert ist und/oder eine DNA gemäß Anspruch 6 aufweist.
9. Ein Verfahren zur Herstellung einer DNA-Polymerase oder deren Klenow-Fragment gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 5 umfassend das Kultivieren einer Wirtszelle gemäß Anspruch 8 und das Isolieren der DNA-Polymerase oder des Klenow-Fragments aus der Kultur oder dem Kulturüberstand.
10. Verwendung der DNA-Polymerase oder des Klenow-Fragments gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 5 in diagnostischen und molekulärbiologischen Verfahren, einschließlich allel-spezifischer PCR, DNA-Amplifikation mittels PCR, Klonierung usw.
11. Ein Verfahren zur Bestimmung der An- oder Abwesenheit von mindestens einer Sequenzvariante in einer oder mehreren Target-Nukleinsäuren in einer individuellen Probe, umfassend die Verwendung einer DNA-Polymerase gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 5.
12. Verfahren gemäß Anspruch 11, enthaltend folgende Schritte:
 - a) Zugabe von
 - Desoxy-Nukleosid-Triphosphaten,
 - einer DNA-Polymerase gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 5,
 - mindestens einem diskriminierenden Primer, enthaltend mindestens einen diskriminierenden Nukleotidrest, wobei für jede nachzuweisende Sequenzvariante einer Target-Nukleinsäure ein Primer zugegeben wird, welcher eine Sequenz komplementär zur nachzuweisenden Sequenzvariante aufweist, und wobei die nachzuweisende Sequenzvariante in der Target-Nukleinsäure komplementär zu mindestens einem 3' terminalen-, 3' proxi-terminalen-, oder 3' proxi-proxi-terminalen Nukleotidrest des diskriminierenden Primers ist,

- mindestens einem weiteren Primer, der komplementär zu einem Primer-Extensionsprodukt, entstehend durch Extension eines diskriminierenden Primers ist;

b) Durchführung einer Primer-Extensionsreaktion, wobei ein Verlängerungsprodukt des diskriminierenden Primers im Wesentlichen nur dann erhalten wird, wenn die Probe eine Target-Nukleinsäure mit der nachzuweisenden Sequenzvariante enthält;

c) Trennung der Produkts der Primer-Extensionsreaktion von der Template Nukleinsäure;

d) Zyklische Wiederholung der Schritte b) und c) zum Erhalt eines Amplifikationsproduktes, beispielsweise durch Polymerase-Kettenreaktion; und

e) Bestimmung der An- oder Abwesenheit einer Sequenzvariante aufgrund der An- oder Abwesenheit des Amplifikationsproduktes.

13. Das Verfahren nach Anspruch 12, wobei die Schritte b) - e) als Real Time PCR oder Real Time RT-PCR durchgeführt werden.

14. Ein Kit zur Bestimmung der An- oder Abwesenheit von mindestens einer Sequenzvariante in einer oder mehreren Target-Nukleinsäuren in einer individuellen Probe gemäß Anspruch 11 bis 13, enthaltend wenigstens eine DNA-Polymerase gemäß Ansprüchen 1 bis 5.

15. Der Kit nach Anspruch 14, zusätzlich enthaltend einen oder mehrere der folgenden Komponenten

- einen oder mehrere diskriminierende Primer, enthaltend mindestens einen diskriminierenden Nukleotidrest, wobei die nachzuweisende Sequenzvariante in der Target-Nukleinsäure komplementär zu mindestens einem 3' terminalen-, 3' proxi-terminalen-, oder 3' proxi-proxi-terminalen Nukleotidrest der diskriminierenden Primer ist,
- einen oder mehrere weitere Primer, die komplementär zu einem Primer-Extensionsprodukt, entstehend durch Extension der diskriminierenden Primer sind,
- Desoxy-Nukleosid-Triphosphate,
- Puffer

- Quantifizierungsreagenzien, insbesondere interkalierende Reagenzien oder in der kleinen Furche anbindendende Reagenzien und
- Polymerase-blockierende Antikörper, insbesondere TaqBlock.

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Rheinische Friedrich-Wilhelms Universität Bonn

<120> Mutierte DNA-Polymerasen mit erhöhter
Fehlpaarungs-Diskriminierung

<130> 040123de JH/BM

<140>

<141>

<160> 29

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 2787

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: E. coli
Wildtyp Klenow Fragment der DNA Polymerase 1

<400> 1

atgttcaga tcccccaaaa tccacttatac cttgttagatg gttcatctta tctttatcg 60
gcataatcagc cgtttcccccc gctgactaac agcgcaggcg agccgaccgg tgcgatgtat 120
gggtgcctca acatgctgcg cagtcgtatc atgcaatata aaccgacgca tgcagcgg 180
gtctttgacg ccaaggaaaa aacctttcgat gatgaactgt ttgaacatata caaatcacat 240
cgcccgccaa tggccgacga tctgcgtgca caaatcgaac cttgcacgc gatggtt 300
gcgatgggac tgccgctgct ggcgggttctt ggcgtagaag cggacgacgt tattcggtact 360
ctggcgccgcg aagccgaaaa agccgggcgt ccgggtctga tcagcactgg cgataaagat 420
atggcgccgcg tggtgacgccc aaatattacat cttatcaata ccatgacgaa taccatcc 480
ggaccggaaag aggtggtaaa taatgtacggc gtggcccgag aactgatcat cgattcc 540
gcgcgtatgg gtgactccctc tgataacatt cctggcgtac cggggcgtcgg tgaaaaacc 600
gcgcaggcat tgctgcaagg tcttggcgga ctggatacgc tttatgcccga gccagaaaa 660
attgctgggt tgagcttccg tggcgccaaa acaatggcag cgaagctcga gcaaaacaaa 720
gaaatgtgtt atctctcata ccagctggcg acgataaaaa ccgacgttga actggagctg 780
acctgtgaac aactggaaatg gcagcaaccg gcagcggaaatg agttgttggg gctgttcaaa 840
aagtatgtatg tcaaacgcgtg gactgctgat gtcgaagcgg gcaaatggg acaggccaaa 900
ggggcaaaac cagccgcgaa gccacaggaa accagtgttgcagacgaaaccgaaatgt 960
acggcaacgg tgatttttta tgacaactac gtcaccatcc ttgtatgaa aacactgaaa 1020
gcgtggatttgcg cgaagctggaa aaaaaggcccg gtatttgcatt ttgataccga aaccgacagc 1080
cttgataaca tctctgttaa cctggcggg ctttcttttgc tttatcgagcc aggcgttagcg 1140
gcataatattc cgggtgcctca tgattatctt gatgcggcccg atcaatctc tcgcgagcgt 1200
gcactcgagt tgctaaaacc gctgctggaa gatgaaaagg cgctgaagggt cgggcaaaac 1260
ctgaaatacgt atcgcggat tctggcgaac tacggcatttgc aactgcgtgg gattgcgttt 1320
gataccatgc tggagtccata catttcataat agcgttgcgg ggcgtcacga tatggacagc 1380
ctcgccgaaac gttgggttggaa gcacaaaacc atcacttttgc aagagatgttgc tgtaaaggc 1440
aaaaatcaac tgacccatataa ccagattgcc ctcgaagaag cccggacgttca cggccggaa 1500
gatgcagatgc tcacccatgc gttgcatttgc aaaaatgtggc cgatctgc aaaaacacaaa 1560
ggccgttgcg acgttccatgc gaatatcgaa atgcccgtgg tggccgggtgtt ttcacgcatt 1620
gaacgtaacg gtgtgaagat cgatccgaaa gttgcgtcaca atcattctgc agagctcacc 1680
cttcgtctgg ctgagctggaa aaagaaaagcg catgaaatttgc caggttgggatgat ttttaacctt 1740
tcttccacca agcagttaca aaccatttgc tttgaaaaac agggcattaa accgcgttgcg 1800
aaaacgcggg gtggcgccgc gtcaacgtcg gaagaggatc tggaaagaact accgcgttgcg 1860
tatccgttgc caaaaatgtat tttggatgcgttgcg cgaagctgaa atcgcacccatc 1920

accgacaaggc tgccgctgat gatcaacccg aaaaccgggc gtgtgcatac ctcttatacac 1980
 caggcagtaa ctgcaacggg acgtttatcg tcaaccgatc ctaacctgca aaacattccg 2040
 gtgcgttaacg aagaaggctcg tcgtatccgc caggcgatc ttgcgcaga ggattatgtg 2100
 atgtgtctcg cggactactc gcagattgaa ctgcgcatta tggcgcatct ttcgcgtgac 2160
 aaaggcttgc tgaccgcatt cgcggaaagga aaagatatcc accgggcaac ggcggcagaa 2220
 gtgtttgggt tgccactgga aaccgtcacc agcagacaa gccgtagcgc gaaagcgtac 2280
 aactttggtc tgatttatgg catgagtgtt ttcggctcgg cgccgcaatt gaacattcca 2340
 cttaaagaag cgcaagta catggacatt tacttcgaac gctaccctgg cgtgctggag 2400
 tatatggaaac gcaccgtgc tcaggcggaa gaggcaggct acgttgaac gctggacgg 2460
 cggcgtctgt atctgccggg tatcaaatcc agcaatggtg ctcgtcgac agcggctgaa 2520
 cgtgcagccca ttaacgcgcc aatgcaggaa accggccggg acattatcaa acgggcgtatg 2580
 atggcgttg atgcgtgggtt acaggctgag caaccgcgtg tacgtatgtat catgcaggta 2640
 cacgatgaac tggatttga agttcataaa gatgatgtt atggcgtcgac gaaacgaggat 2700
 catcaactga tggaaaactg taccgcgtcgt gatgtgcgt tgctgggtgaa agtggggaggt 2760
 ggcggaaaact gggatcaggc gcaactaa 2787

<210> 2

<211> 928

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: E.coli
Klenow Fragment der DNA Polymerase 1

<400> 2

Met Val Gln Ile Pro Gln Asn Pro Leu Ile Leu Val Asp Gly Ser Ser
 1 5 10 15

Tyr Leu Tyr Arg Ala Tyr His Ala Phe Pro Pro Leu Thr Asn Ser Ala
 20 25 30

Gly Glu Pro Thr Gly Ala Met Tyr Gly Val Leu Asn Met Leu Arg Ser
 35 40 45

Leu Ile Met Gln Tyr Lys Pro Thr His Ala Ala Val Val Phe Asp Ala
 50 55 60

Lys Gly Lys Thr Phe Arg Asp Glu Leu Phe Glu His Tyr Lys Ser His
 65 70 75 80

Arg Pro Pro Met Pro Asp Asp Leu Arg Ala Gln Ile Glu Pro Leu His
 85 90 95

Ala Met Val Lys Ala Met Gly Leu Pro Leu Leu Ala Val Ser Gly Val
 100 105 110

Glu Ala Asp Asp Val Ile Gly Thr Leu Ala Arg Glu Ala Glu Lys Ala
 115 120 125

Gly Arg Pro Val Leu Ile Ser Thr Gly Asp Lys Asp Met Ala Gln Leu
 130 135 140

Val Thr Pro Asn Ile Thr Leu Ile Asn Thr Met Thr Asn Thr Ile Leu
 145 150 155 160

Gly Pro Glu Glu Val Val Asn Lys Tyr Gly Val Pro Pro Glu Leu Ile

165

170

175

Ile Asp Phe Leu Ala Leu Met Gly Asp Ser Ser Asp Asn Ile Pro Gly
 180 185 190

Val Pro Gly Val Gly Glu Lys Thr Ala Gln Ala Leu Leu Gln Gly Leu
 195 200 205

Gly Gly Leu Asp Thr Leu Tyr Ala Glu Pro Glu Lys Ile Ala Gly Leu
 210 215 220

Ser Phe Arg Gly Ala Lys Thr Met Ala Ala Lys Leu Glu Gln Asn Lys
 225 230 235 240

Glu Val Ala Tyr Leu Ser Tyr Gln Leu Ala Thr Ile Lys Thr Asp Val
 245 250 255

Glu Leu Glu Leu Thr Cys Glu Gln Leu Glu Val Gln Gln Pro Ala Ala
 260 265 270

Glu Glu Leu Leu Gly Leu Phe Lys Lys Tyr Glu Phe Lys Arg Trp Thr
 275 280 285

Ala Asp Val Glu Ala Gly Lys Trp Leu Gln Ala Lys Gly Ala Lys Pro
 290 295 300

Ala Ala Lys Pro Gln Glu Thr Ser Val Ala Asp Glu Ala Pro Glu Val
 305 310 315 320

Thr Ala Thr Val Ile Ser Tyr Asp Asn Tyr Val Thr Ile Leu Asp Glu
 325 330 335

Glu Thr Leu Lys Ala Trp Ile Ala Lys Leu Glu Lys Ala Pro Val Phe
 340 345 350

Ala Phe Asp Thr Glu Thr Asp Ser Leu Asp Asn Ile Ser Ala Asn Leu
 355 360 365

Val Gly Leu Ser Phe Ala Ile Glu Pro Gly Val Ala Ala Tyr Ile Pro
 370 375 380

Val Ala His Asp Tyr Leu Asp Ala Pro Asp Gln Ile Ser Arg Glu Arg
 385 390 395 400

Ala Leu Glu Leu Leu Lys Pro Leu Leu Glu Asp Glu Lys Ala Leu Lys
 405 410 415

Val Gly Gln Asn Leu Lys Tyr Asp Arg Gly Ile Leu Ala Asn Tyr Gly
 420 425 430

Ile Glu Leu Arg Gly Ile Ala Phe Asp Thr Met Leu Glu Ser Tyr Ile
 435 440 445

Leu Asn Ser Val Ala Gly Arg His Asp Met Asp Ser Leu Ala Glu Arg
 450 455 460

Trp Leu Lys His Lys Thr Ile Thr Phe Glu Glu Ile Ala Gly Lys Gly
 465 470 475 480

Lys Asn Gln Leu Thr Phe Asn Gln Ile Ala Leu Glu Glu Ala Gly Arg
 485 490 495
 Tyr Ala Ala Glu Asp Ala Asp Val Thr Leu Gln Leu His Leu Lys Met
 500 505 510
 Trp Pro Asp Leu Gln Lys His Lys Gly Pro Leu Asn Val Phe Glu Asn
 515 520 525
 Ile Glu Met Pro Leu Val Pro Val Leu Ser Arg Ile Glu Arg Asn Gly
 530 535 540
 Val Lys Ile Asp Pro Lys Val Leu His Asn His Ser Glu Glu Leu Thr
 545 550 555 560
 Leu Arg Leu Ala Glu Leu Glu Lys Lys Ala His Glu Ile Ala Gly Glu
 565 570 575
 Glu Phe Asn Leu Ser Ser Thr Lys Gln Leu Gln Thr Ile Leu Phe Glu
 580 585 590
 Lys Gln Gly Ile Lys Pro Leu Lys Lys Thr Pro Gly Gly Ala Pro Ser
 595 600 605
 Thr Ser Glu Glu Val Leu Glu Glu Leu Ala Leu Asp Tyr Pro Leu Pro
 610 615 620
 Lys Val Ile Leu Glu Tyr Arg Gly Leu Ala Lys Leu Lys Ser Thr Tyr
 625 630 635 640
 Thr Asp Lys Leu Pro Leu Met Ile Asn Pro Lys Thr Gly Arg Val His
 645 650 655
 Thr Ser Tyr His Gln Ala Val Thr Ala Thr Gly Arg Leu Ser Ser Thr
 660 665 670
 Asp Pro Asn Leu Gln Asn Ile Pro Val Arg Asn Glu Glu Gly Arg Arg
 675 680 685
 Ile Arg Gln Ala Phe Ile Ala Pro Glu Asp Tyr Val Ile Val Ser Ala
 690 695 700
 Asp Tyr Ser Gln Ile Glu Leu Arg Ile Met Ala His Leu Ser Arg Asp
 705 710 715 720
 Lys Gly Leu Leu Thr Ala Phe Ala Glu Gly Lys Asp Ile His Arg Ala
 725 730 735
 Thr Ala Ala Glu Val Phe Gly Leu Pro Leu Glu Thr Val Thr Ser Glu
 740 745 750
 Gln Arg Arg Ser Ala Lys Ala Ile Asn Phe Gly Leu Ile Tyr Gly Met
 755 760 765
 Ser Ala Phe Gly Leu Ala Arg Gln Leu Asn Ile Pro Arg Lys Glu Ala
 770 775 780

Gln Lys Tyr Met Asp Leu Tyr Phe Glu Arg Tyr Pro Gly Val Leu Glu
 785 790 795 800
 Tyr Met Glu Arg Thr Arg Ala Gln Ala Lys Glu Gln Gly Tyr Val Glu
 805 810 815
 Thr Leu Asp Gly Arg Arg Leu Tyr Leu Pro Asp Ile Lys Ser Ser Asn
 820 825 830
 Gly Ala Arg Arg Ala Ala Ala Glu Arg Ala Ala Ile Asn Ala Pro Met
 835 840 845
 Gln Gly Thr Ala Ala Asp Ile Ile Lys Arg Ala Met Ile Ala Val Asp
 850 855 860
 Ala Trp Leu Gln Ala Glu Gln Pro Arg Val Arg Met Ile Met Gln Val
 865 870 875 880
 His Asp Glu Leu Val Phe Glu Val His Lys Asp Asp Val Asp Ala Val
 885 890 895
 Ala Lys Gln Ile His Gln Leu Met Glu Asn Cys Thr Arg Leu Asp Val
 900 905 910
 Pro Leu Leu Val Glu Val Gly Ser Gly Glu Asn Trp Asp Gln Ala His
 915 920 925

<210> 3
 <211> 2499

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Wildtyp Taq
Polymerase

<400> 3

atgaggggga tgctgcccct ctttgagccc aaggggccggg tcctcctggg ggacggccac 60
 cacctggcct accgcaccc ttccacgcccctg aaggggccctca ccaccagccg gggggagccg 120
 gtgcaggccg tctacggctt cgccaaagago ctcctcaagg ccctcaagga ggacggggac 180
 gcggtgatcg tggcttttga cgccaaaggcc ccctcccttcc gccacgaggc ctacgggggg 240
 tacaaggccg gccggggccccc caccggccggag gactttcccc ggcaactcgc cctcatcaag 300
 gagctggtgg acctccttggg gctggcgccg ctcgaggtcc cgggctacga ggcggacgac 360
 gtcctggcca gcttggccaa gaaggccggaa aaggagggtt acgagggtccg catccctcacc 420
 gcccacaaag acctttatcca gctcccttcc gaccgcattcc acgttccctcca ccccgagggg 480
 tacctcatca ccccgccctg gcttgggaa aagtacggcc tgaggcccg ccagtggggcc 540
 gactaccggg ccctgaccgg ggacgagtcc gacaaccttc cccggggtaaa gggcatcgaa 600
 gagaagacgg cgaggaagct tctggaggag tgggggagcc tggaaagccct cctcaagaac 660
 ctggaccggc tgaagccgc catccggag aagatcctgg cccacatggc cgatctgaag 720
 ctctccttggg acctggccaa ggtgcgcacc gacccatggc tgaggtggc cttcgccaaa 780
 aggccggagc ccgaccggga gaggcttagg gcctttctgg agaggcttgc gtttggcagc 840
 ctccctccacg agttcggcct tctggaaagc cccaaaggccc tggaggaggc cccctggccc 900
 cccgccggaaag gggcccttgc gggcttgc ctttcccgca aggagcccat gtggggcgat 960
 cttctggccc tggccgccc cagggggggc cgggtccacc gggcccccga gcctataaa 1020

gcccctcaggg acctgaagga ggccgcggggg cttctcgcca aagacctgag cgttctggcc 1080
 ctgagggaaag gccttggcct cccgccccgc gacgacccca tgctcctcgc ctacctcctg 1140
 gacccttcca acaccacccc cgagggggtg gcccggcgct acggcgggga gtggacggag 1200
 gagggcggggg agcgggcccgc ctittcccgag aggcttctcg ccaacctgtg ggggaggctt 1260
 gaggggggagg agaggctcct ttggcttac cgggaggtgg agaggccctt ttccgctgtc 1320
 ctggcccaaca tggaggccac ggggggtgcgc ctggacgtgg cctatctcag ggccttgc 1380
 ctggaggtgg ccgaggagat cgcccgccctc gaggccgagg tcttccgcct ggcggccac 1440
 cccctcaacc tcaactccccg ggaccagctg gaaagggtcc tctttgacga gctagggctt 1500
 cccgccccatcg gcaagacgga gaagagccggc aagcgctcca ccagcgccgc cgtcctggag 1560
 gcccctcgcg aggcccaccc catcggtggag aagatcctgc agtaccggga gtcacccaag 1620
 ctgaagagca cctacattga ccccttgcgg gacccatcc accccaggac gggccgcctc 1680
 cacaccgcgt tcaacccagac ggccacggcc acgggcaggc taagtagctc cgatcccaac 1740
 ctccagaaca tccccgtccg caccggcctt gggcagagga tccggccggc cttcatcgcc 1800
 gaggaggggt ggctatttggt ggccttggac tataccaga tagagctcag ggttctggcc 1860
 cacctctccg ggcacgagaa cctgtatccgg gtcttccagg agggccggga catccacacg 1920
 gagaccgcca gtcggatgtt cggcgccccg cgggaggccg tggaccctt gatggccgg 1980
 gcccacaaga ccatcaactt cggggtcctc tacggcatgt cggccacccg cctctcccaag 2040
 gagctagccia tcccttacga ggaggcccgag gccttcattt agcgctactt tcagagcttc 2100
 cccaagggtgc gggccttggat tgagaagacc ctggaggagg gcaggaggcg ggggtacgtg 2160
 gagaccctct tcggccggcc cgcgtacgt ccagacccatgggcccgggtaaagagcg 2220
 cgggaggccg cggagccat ggccttcaac atgcccgtcc agggcaccgc cccgaccc 2280
 atgaagctgg ctatggtgaa gtccttcccc aggcttggagg aaatgggggc cagatgctc 2340
 cttcaggtcc acgacgagct ggtcctcgag gcccctaaag agaggccgga ggcgttggcc 2400
 cggctggcca aggaggcat ggaggggggt tatcccttgg ccgttccctt ggaggtggag 2460
 gtggggatag gggaggactg gtcctccgc aaggagtga 2499

<210> 4

<211> 832

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220> ..

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Wildtyp Taq Polymerase

<400> 4

Met Arg Gly Met Leu Pro Leu Phe Glu Pro Lys Gly Arg Val Leu Leu
 1 5 10 15

Val Asp Gly His His Leu Ala Tyr Arg Thr Phe His Ala Leu Lys Gly
 20 25 30

Leu Thr Thr Ser Arg Gly Glu Pro Val Gln Ala Val Tyr Gly Phe Ala
 35 40 45

Lys Ser Leu Leu Lys Ala Leu Lys Glu Asp Gly Asp Ala Val Ile Val
 50 55 60

Val Phe Asp Ala Lys Ala Pro Ser Phe Arg His Glu Ala Tyr Gly Gly
 65 70 75 80

Tyr Lys Ala Gly Arg Ala Pro Thr Pro Glu Asp Phe Pro Arg Gln Leu
 85 90 95

Ala Leu Ile Lys Glu Leu Val Asp Leu Leu Gly Leu Ala Arg Leu Glu
 100 105 110

Val Pro Gly Tyr Glu Ala Asp Asp Val Leu Ala Ser Leu Ala Lys Lys
 115 120 125

Ala Glu Lys Glu Gly Tyr Glu Val Arg Ile Leu Thr Ala Asp Lys Asp
 130 135 140

Leu Tyr Gln Leu Leu Ser Asp Arg Ile His Val Leu His Pro Glu Gly
 145 150 155 160

Tyr Leu Ile Thr Pro Ala Trp Leu Trp Glu Lys Tyr Gly Leu Arg Pro
 165 170 175

Asp Gln Trp Ala Asp Tyr Arg Ala Leu Thr Gly Asp Glu Ser Asp Asn
 180 185 190

Leu Pro Gly Val Lys Gly Ile Gly Glu Lys Thr Ala Arg Lys Leu Leu
 195 200 205

Glu Glu Trp Gly Ser Leu Glu Ala Leu Leu Lys Asn Leu Asp Arg Leu
 210 215 220

Lys Pro Ala Ile Arg Glu Lys Ile Leu Ala His Met Asp Asp Leu Lys
 225 230 235 240

Leu Ser Trp Asp Leu Ala Lys Val Arg Thr Asp Leu Pro Leu Glu Val
 245 250 255

Asp Phe Ala Lys Arg Arg Glu Pro Asp Arg Glu Arg Leu Arg Ala Phe
 260 265 270

Leu Glu Arg Leu Glu Phe Gly Ser Leu Leu His Glu Phe Gly Leu Leu
 275 280 285

Glu Ser Pro Lys Ala Leu Glu Glu Ala Pro Trp Pro Pro Pro Glu Gly
 290 295 300

Ala Phe Val Gly Phe Val Leu Ser Arg Lys Glu Pro Met Trp Ala Asp
 305 310 315 320

Leu Leu Ala Leu Ala Ala Ala Arg Gly Gly Arg Val His Arg Ala Pro
 325 330 335

Glu Pro Tyr Lys Ala Leu Arg Asp Leu Lys Glu Ala Arg Gly Leu Leu
 340 345 350

Ala Lys Asp Leu Ser Val Leu Ala Leu Arg Glu Gly Leu Gly Leu Pro
 355 360 365

Pro Gly Asp Asp Pro Met Leu Leu Ala Tyr Leu Leu Asp Pro Ser Asn
 370 375 380

Thr Thr Pro Glu Gly Val Ala Arg Arg Tyr Gly Gly Glu Trp Thr Glu
 385 390 395 400

Glu Ala Gly Glu Arg Ala Ala Leu Ser Glu Arg Leu Phe Ala Asn Leu
 405 410 415

Trp Gly Arg Leu Glu Gly Glu Glu Arg Leu Leu Trp Leu Tyr Arg Glu

420

425

430

Val Glu Arg Pro Leu Ser Ala Val Leu Ala His Met Glu Ala Thr Gly
 435 440 445

Val Arg Leu Asp Val Ala Tyr Leu Arg Ala Leu Ser Leu Glu Val Ala
 450 455 460

Glu Glu Ile Ala Arg Leu Glu Ala Glu Val Phe Arg Leu Ala Gly His
 465 470 475 480

Pro Phe Asn Leu Asn Ser Arg Asp Gln Leu Glu Arg Val Leu Phe Asp
 485 490 495

Glu Leu Gly Leu Pro Ala Ile Gly Lys Thr Glu Lys Thr Gly Lys Arg
 500 505 510

Ser Thr Ser Ala Ala Val Leu Glu Ala Leu Arg Glu Ala His Pro Ile
 515 520 525

Val Glu Lys Ile Leu Gln Tyr Arg Glu Leu Thr Lys Leu Lys Ser Thr
 530 535 540

Tyr Ile Asp Pro Leu Pro Asp Leu Ile His Pro Arg Thr Gly Arg Leu
 545 550 555 560

His Thr Arg Phe Asn Gln Thr Ala Thr Ala Thr Gly Arg Leu Ser Ser
 565 570 575

Ser Asp Pro Asn Leu Gln Asn Ile Pro Val Arg Thr Pro Leu Gly Gln
 580 585 590

Arg Ile Arg Arg Ala Phe Ile Ala Glu Glu Gly Trp Leu Leu Val Ala
 595 600 605

Leu Asp Tyr Ser Gln Ile Glu Leu Arg Val Leu Ala His Leu Ser Gly
 610 615 620

Asp Glu Asn Leu Ile Arg Val Phe Gln Glu Gly Arg Asp Ile His Thr
 625 630 635 640

Glu Thr Ala Ser Trp Met Phe Gly Val Pro Arg Glu Ala Val Asp Pro
 645 650 655

Leu Met Arg Arg Ala Ala Lys Thr Ile Asn Phe Gly Val Leu Tyr Gly
 660 665 670

Met Ser Ala His Arg Leu Ser Gln Glu Leu Ala Ile Pro Tyr Glu Glu
 675 680 685

Ala Gln Ala Phe Ile Glu Arg Tyr Phe Gln Ser Phe Pro Lys Val Arg
 690 695 700

Ala Trp Ile Glu Lys Thr Leu Glu Glu Gly Arg Arg Arg Gly Tyr Val
 705 710 715 720

Glu Thr Leu Phe Gly Arg Arg Arg Tyr Val Pro Asp Leu Glu Ala Arg
 725 730 735

Val Lys Ser Val Arg Glu Ala Ala Glu Arg Met Ala Phe Asn Met Pro
 740 745 750
 Val Gln Gly Thr Ala Ala Asp Leu Met Lys Leu Ala Met Val Lys Leu
 755 760 765
 Phe Pro Arg Leu Glu Glu Met Gly Ala Arg Met Leu Leu Gln Val His
 770 775 780
 Asp Glu Leu Val Leu Glu Ala Pro Lys Glu Arg Ala Glu Ala Val Ala
 785 790 795 800
 Arg Leu Ala Lys Glu Val Met Glu Gly Val Tyr Pro Leu Ala Val Pro
 805 810 815
 Leu Glu Val Glu Val Gly Ile Gly Glu Asp Trp Leu Ser Ala Lys Glu
 820 825 830

<210> 5
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

<220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer
 <400> 5
 gtacgtatga tcatgnnnnn nnnngatgaa ctggattt

39

<210> 6
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

<220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
 Downstream-Primer

<400> 6
 gctaattaag cttggctgca ggc

23

<210> 7
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

<220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
 Antisense-Primer

<400> 7

tacatggacc tttacttcga acgc

24

<210> 8
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

<220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer
 FVL20TH

<400> 8
 acaaaaatacc tgtattccctt

20

<210> 9
 <211> 90
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

<220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Matrize
 TFVL90A

<400> 9
 gacatcatga gagacatcgc ctctgggcta ataggactac ttctaatctg taagagcaga 60
 tccctggaca ggcaaggaaat acaggtattt 90

<210> 10
 <211> 90
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

<220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Matrize
 TFVL90G

<400> 10
 gacatcatga gagacatcgc ctctgggcta ataggactac ttctaatctg taagagcaga 60
 tccctggaca ggcgaggaat acaggtattt 90

<210> 11
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

<220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer zur
 Detektion des SNPs in der humanen genomische
 Factor-V-Leiden-DNA-Sequenz

<400> 11
 acaaaaatacc tgtattccctn

20

<210> 12
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

 <220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Matrize der
 humanen genomischen Factor-V-Leiden-DNA-Sequenz;
 n=g, Wildtypmatrize; n=a, mutante Matrize

 <400> 12
 gatccctgga caggcnagga atacaggtat tttgt

35

<210> 13
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

 <220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer zur
 Detektion der humanen somatische
 BRAF-T1796A-Mutation

 <400> 13
 gaccgcactcc atcgagattt ct

22

<210> 14
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

 <220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Wildtyp
 Matrize des BRAF Gens; w= t, Wildtypmatrize; w =
 a, mutante Matrize

 <400> 14
 ggctctagcta cagwgaaaatc tcgatggagt gggtc

35

<210> 15
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

 <220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer zur
 Detektion der humanen
 Dihydropyrimidin-Dehydrogenase (DPyD) Mutation
 G735A

<400> 15
 gtttttagatg tttaaatcaca cttat

25

<210> 16



<211> 38
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Matrize
 des humanen DPyD; r = g, Wildtypmatrize; r = a,
 mutante Matrize

<400> 16

ctttccagac aacrtaagtg tgatttaaca tctaaaac

38

<210> 17
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primär zur
 Detektion der humanen sauren Ceramidase Mutation
 A107G

<400> 17

cgttggtcct gaaggaggat

20

<210> 18
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Matrize der
 humanen sauren Ceramidase; r = a, Wildtypmatrize;
 r = g, mutante Matrize

<400> 18

aaatcaaacct rtccctccttc aggaccaacg tac

33

<210> 19
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primersonde
 Braft

<400> 19

gaccactcc atcgagattt ct

22

<210> 20
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: umgekehrter
Primer für BRAF

<400> 20

agaggaaaga tgaagtacta tg

22

<210> 21

<211> 239

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Zielmatrize
BrafX; w = a, Braf A (Wildtyp); w = t, BrafT
(Mutante)

<400> 21

caactgttca aactgatggg acccactccä tcgagatttc wctgttagcta gaccaaaaatc 60
acctattttt actgtgaggt cttcatgaag aaatataatct gaggtgttagt aagtaaagga 120
aaacagttaga tctcattttc ctatcagagc aagcattatg aagagtttag gtaagagatc 180
taatttctat aattctgtaa tataatattc tttaaaacat agtacttcat ctttcctct 239

<210> 22

<211> 25

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primersonde
DpyDT

<400> 22

gttttagatg ttaaatcaca cttat

25

<210> 23

<211> 23

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: umgekehrter
Primer für DpyDT

<400> 23

aaagctcctt tctgaatatt gag

23

<210> 24

<211> 300

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Zielmatrize
 DpyDX; r = a, DpyDA (Wildtyp); r = t, DpyDT
 (Mutante)

<400> 24

aaaatgtgag aaggcacctc ataaaaatatg tcatatggaa atgagcagat aataaaagatt 60
 atagcttttc tttgtcaaaa ggagactcaa tatcttact ctttcatcg gacattgtga 120
 caaatgtttc cccccagaatc atccggggaa ccacctctgg ccccatgtat ggccctggac 180
 aaagctccctt tctgaatatt gagctcatca gtgagaaaaac ggctgcatat tgggtgtcaaa 240
 gtgtcactga actaaaggct gactttccag acaacrtaaag tgtgatttaa catctaaaaac 300

<210> 25

<211> 7043

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: pTTQ18::Taq

<400> 25

gaactggatc tcaacagcgg taagatccctt gagagtttc gccccgaaga acgttttcca 60
 atgatgagca cttttaaagt tctgtatgtt ggcgcggat tatcccgat tgacgcccgg 120
 caagagcaac tcgggtcgccg catacactat tctcagaatg acttgggtga gtactcacca 180
 gtcacagaaaa agcatcttac ggatggcatg acagtaagag aattatgcag tgctgccata 240
 accatgatgttataaactgc gccaactta cttctgacaa cgatcggagg accgaaggag 300
 ctaaccgctt ttttgcacaa catggggat catgtaaactc gccttgatcg ttgggaaccg 360
 gagctgaatg aagccataacc aaacgacgag cgtgacacca cgatgcctgt agcaatggca 420
 acaacgttgc gcaaactatt aactggcgaa ctacttactc tagttcccg gcaacaatta 480
 atagacttggatggaggcgaa taaagtgtca ggaccacttc tgctcgccg ccttccggct 540
 ggctgggtta ttgctgatata atctggagcc ggtgagctg ggtctcgccg tattcatgtca 600
 gcaactggggc cagatgttaa gcccctccgt atcgtatgtt tctacacac ggggagtcag 660
 gcaactatgg atgaacgaaa tagacagatc gctgagatag tgtaactgtt cagaccaatgtt 720
 ttgatttaaa acttcatitt 780
 taatttaaaa ggtatcttagt gaagatccctt ttgtataatc tcatgaccaa aatcccttaa 840
 cgtgagttt cgttccactg agcgtcagac cccgtagaaa agatcaaagg atcttcttga 900
 gatcctttt ttctgcgcgt aatctgtc ttgcaaaacaa aaaaaccacc gctaccagcg 960
 gtgggttggatggccgtca agagctacca actcttttc cgaaggttaac tggcttcagc 1020
 agagcgcaga taccaataac tgccttcttgcgt tgtagccgt agttaggcca ccacttcaag 1080
 aactctgttag caccgcctac atacctcgct ctgtatcc tgtagccgt gatagttacc ggataaggcg 1140
 agtggcgata agtcgtgtct taccgggttg gactcaagac gtttggagcg aacgacctac 1200
 cagcggtcgg gctgaacggg gggttcgtgc acacagccca ccacgttcc cgaagggaga 1260
 accgaactga gataacctaca gcgtgagcat tgagaaagcg gagagcgcac gagggagctt 1320
 aaggcggaca ggtatccggta aagcggcagg gtcgaaacag gagagcgcac gagggagctt 1380
 ccagggggaa acgcctggta tctttatagt cctgtcggtt ttcgcccaccc ctgacttgag 1440
 cgtcgatttt tgcgtatgtc gtcagggggg cggagccat gaaaaaaacgc cagcaacgcg 1500
 gcctttttac ggttccctggc cttttgtctgg cttttgtctc acatgttctt tcctgcgtta 1560
 tccccctgatctgtgatataa cctgtttagtcc gcctttagt gagctgatatac cgctcgccgc 1620
 agccgaacga ccgagcgcag cgagtcagtg agcgaggaag cggaaagagcg cccaaatacgc 1680
 aaaccgcctc tccccgcgc ttggccgat cattaatgcataaattc tcatgttga 1740
 cagcttatac tgcgtgcac ggtgcacccaa tgctctggc gtcaggcagc catcggaaagc 1800
 tgggttatgg ctgtgcaggat cgtaaatcac tgcataattc gtgtcgctca aggcgcactc 1860
 ccgttctggta taatgtttt tgcgcgcaca tcataacgggt tctggcaaat attctgaaat 1920
 gagctgtgtca caattaatca tcggctcgta taatgtgtgg aattgtgagc ggataacaat 1980
 ttcacacagg aaacagcgtt gattcgggg atgcgtcccc tctttgagcc caagggccgg 2040
 gtcttcctgg tggacggcca ccacctggcc taccgcaccc tccacgcctt gaagggccctc 2100
 accaccagcc ggggggagcc ggtgcaggcg gtctacggct tgcgcacag cctcctcaag 2160
 gcccctcaagg aggacgggga cgcggtgatc gtggctttt acgccaaggg cccctcccttc 2220

cgccacgagg cctacgggggt gtacaaggcg ggccggggccc ccacgcccga ggactttccc 2280
 cgccaactcg ccctcatcaa ggagctgggt gacccctggg ggctggcgcg cctcgaggc 2340
 cccggctacg aggcgacga cgtccctggcc agccctggcca agaaggcgga aaaggagggc 2400
 tacgagggtcc gcatcctcac cggcgacaaa gaccttacc agctccttc cgaccgc 2460
 cacgtcctcc accccgaggg gtacctcatc accccggct ggcttggga aaagtacggc 2520
 ctgaggcccc accagtgggc cgactaccgg gcccgtaccg gggacgagtc cgacacaac 2580
 cccggggctca agggcatcg ggagaagacg gcgaggaagc ttctggagga gtgggggagc 2640
 ctggaaagccc tcctcaagaa cctggaccgg ctgaagccc ccattccggga gaagatctg 2700
 gcccacatgg acgatctgaa gcttcctgg gacctggcca aggtgcgcac cgacacgtccc 2760
 ctggaggtgg acttcgccaa aaggcgggag cccgaccggg agaggcttag ggcctttctg 2820
 gagaggcttg agtttggcag ctcctccac gagtccggcc ttctggaaag ccccaaggcc 2880
 ctggaggagg cccctggcc cccgcccggaa ggggccttcg tgggctttgt gctttccgc 2940
 aaggagccca tggggccga tcttcctggcc ctggccggcc ccaggggggg ccgggtccac 3000
 cggggccccc agccttataa agccctcagg gacctgaagg aggccggggg gcttctcgcc 3060
 aaagacctga gcttctggc ctcgtgggaa ggccttggcc tcccgccccc cgacgacccc 3120
 atgctcctcg ctcaccccttcc gaccccttcc aacaccaccc cggagggggt ggcccgccgc 3180
 tacggggggg agtggacgga ggaggcgggg gaggccggc cccttccga gaggtcttc 3240
 gcaacactgt gggggagggt tgagggggag gagaggctcc ttggcttta ccgggaggtg 3300
 gagaggcccc ttccgtgt ctcgtggccac atggaggcga cgggggtgcg ctcggacgtg 3360
 gcttatctca gggccttgc ctcgtggagggt gcccggaga tcgcccgcct cgaggccgag 3420
 gtcttcgcgc tggccggcca ccccttcaac ctcaactccc gggaccagct ggaaagggtc 3480
 ctcttgcacg agctagggtc tcccgccatc gcaagacgg agaagaccgg caagcgctcc 3540
 accacgcggc cctgttcgtt ggcctccgc gaggccacc ccattcggttga gaagatctg 3600
 cagtacgggg agtcaccaa gtcgtggaggc acctacattt accccttgc ggcacttcac 3660
 cacccccagga cgggcccgcct ccacacccgc ttcaaccaga cggccacggc caoggccagg 3720
 ctaagtagct ccgtatccaa ctcgtggggc atccctgtcc gcaccccgct tggcagagg 3780
 atccggccggg ctttcatttcg ctcgtggggg ttggcttatttttggccttgcgatccag 3840
 atagagctca ggggtctggc ccacctcttc ggcgtggcggg acgtggatgt tggcccttgcgatccag 3900
 gaggggccggg acatccacac ggagaccggc agctggatgt tggccgtccc ccgggaggcc 3960
 gtggacccccc tggatgtggc ggcggccaa accatcaact tggccgtccc ctacggcatg 4020
 tcggccacc gcttcatttcg ggtggggcggg atcccttacg aggaggccca ggccttcatt 4080
 gagcgtact ttccagagctt ccccaagggtt cgggcttgc ttgagaagac cctggaggag 4140
 ggcaggaggc ggggtacgt ggagaccctt ttcggccgc gccgttccaa catggccgtc 4200
 gagggccccc tgaagagcgt gcccggggc gccgtggcga tggaggggtt gtatccccctg 4440
 cagggcaccg ccgttccaa catgtggggcgtt gctatgggtt ggcgttccgc caaggagtga 4500
 gaaatggggg ccaggatgtt ctttcagggtt cacgtggggcggc tggcccttgc ggcgttccgc 4560
 gagagggccgg agggccgtt ccggcttgcg aaggagggtt tggaggggtt gtatccccctg 4620
 gccgtggccc tggaggtggc ggtgggggata ggggaggact tggccgttccgc 4680
 tagatccctt agagtcgacc tgcaggatgtt caagtttgcg tggccgttccgc 4740
 gtcgtactt gggaaaaccctt ggcgttaccctt aacttaatcg ctttcagggtt gtcgttccgc 4800
 tcgcccactt gctgtataggc gaagaggccc gacccatcg ttttcagggtt gtcgttccgc 4860
 gctgtatggc cgaatggccgc ctgtatgttgcg attttcttcc ttttcagggtt gtcgttccgc 4920
 cacaccgtat aaattccctt ttttggccgtt tgaggtggggat tggccgttccgc 4980
 aatccgtat gtcgttccgc ttttggccgtt tgatgttgcg ttttggccgtt gtcgttccgc 5040
 aatccgtat gtcgttccgc ttttggccgtt tgatgttgcg ttttggccgtt gtcgttccgc 5100
 acggccgtat taaacttgcgtt gtcgttccgc ttttggccgtt tgatgttgcg ttttggccgtt gtcgttccgc 5160
 ttttggccgtt ctacaaactt ttcgttgcgtt catacttaca gtcgttccgc 5220
 ggttttttgcgtt ttttggccgtt gtcgttccgc ttttggccgtt gtcgttccgc 5280
 aatctgttcc gtcgttccgc ttttggccgtt gtcgttccgc ttttggccgtt gtcgttccgc 5340
 gtcgttccgc ttttggccgtt gtcgttccgc ttttggccgtt gtcgttccgc 5400
 gagctgttcc gtcgttccgc ttttggccgtt gtcgttccgc ttttggccgtt gtcgttccgc 5460
 cgtgtatccgc ttttggccgtt gtcgttccgc ttttggccgtt gtcgttccgc 5520
 ttctgttcc gtcgttccgc ttttggccgtt gtcgttccgc ttttggccgtt gtcgttccgc 5580
 ggaagaggtt gtcgttccgc ttttggccgtt gtcgttccgc ttttggccgtt gtcgttccgc 5640
 gtatgttcc gtcgttccgc ttttggccgtt gtcgttccgc ttttggccgtt gtcgttccgc 5700

tgcgaaaacg	cggaaaaaaag	tggaaagcggc	gatggcggag	ctgaattaca	ttcccaacccg	5760
cgtggcacaa	caactggcg	gcaaacagtc	gttgcgtatt	ggcgttgcca	cctccagtc	5820
ggccctgcac	gccccgtcgc	aaatttgcgc	ggcgattaaa	tctcgcccg	atcaactggg	5880
tgcccagcgt	gtgggtgtcg	tggtagaacg	aagcggcgtc	gaaggctgt	aaggccgggt	5940
gcacaatctt	ctcgcgcaac	gcgtcaagtgg	gctgatcatt	aactatccgc	tggatgacca	6000
ggatgccatt	gctgtggaaag	ctgcctgcac	taatgttccg	gcgttatttc	ttgatgttc	6060
tgaccagaca	cccatcaaca	gtattatttt	ctcccatgaa	gacgtacgc	gactggcggt	6120
ggagcatctg	gtcgcattgg	gtcaccagca	aatcgcgtc	ttagcgggccc	cattaagttc	6180
tgtctcgcg	cgtctcggtc	tggctggctg	gcataaaatat	ctcactcgca	atcaaattca	6240
gccgatagcg	gaacggaaag	gcgactggag	tgccatgtcc	ggtttcaac	aaaccatgca	6300
aatgctgaat	gagggcattcg	ttcccaactgc	gatgctgggt	gccaacgatc	agatggcgct	6360
gggcgcaatg	cgcgcattta	ccgagtcggg	gctgcgcgtt	ggtgcggata	tctcggtagt	6420
gggataacgac	gataccgaaag	acagctcatg	ttatatcccg	ccgttaacca	ccatcaaaca	6480
ggatttgcgc	ctgctggggc	aaaccagcgt	ggaccgcctt	ctgcaactct	ctcagggcca	6540
ggcggtgaag	ggcaatcagc	tgttgcgcgt	ctcaactgggt	aaaagaaaaaa	ccaccctggc	6600
gccccatacg	caaaccgcct	ctccccgcgc	gttggccgat	tcattaatgc	agctggcaacg	6660
acaggtttcc	cgactggaaa	gcgggcagtg	agcgcaacgc	aattaatgt	agtttagotca	6720
ctcattaggc	accccaggct	ttacacttta	tgcttccgac	ctgcaagaac	ctcacgtcag	6780
gtggcacttt	tcggggaaat	gtgcgggaa	cccttatttt	tttatttttc	taaatacatt	6840
caaataatgt	tccgctcatg	agacaataac	cctgataaat	gcttcataaa	tattgaaaaa	6900
ggaagagttat	gagtattcaa	cattttcggt	tcgcccattat	tcccttttt	gccccatttt	6960
gccttcctgt	ttttgctcac	ccagaaacgc	ttgtgaaagt	aaaagatgct	gaagatcagt	7020
tgggtgacg	agtgggttac	atc				7043

<210> 26
<211> 10534

<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: pQE30

<400> .26

ctcgagaaaat cataaaaaat ttatttgctt tgtgagcga taacaattat aatagattca 60
attgtgagcg gataagagct ctttagtatt ttttaaataa acgaaacact cgcctattgt 120
taatattatc taagttaca ctcgcctatt caatttcaca cagaattcat taaagaggag 180
aaatttaacta tgagaggatc gcatcaccat caccatcacg gatcgttaa agtgtgtctt 240
aagtaatttc tcctctttaa tlgatactct cctagcgtag tggtagtgg agtgcttagg 300-
acggcaacgg tgatttctta tgacaaactac gtcaccatcc ttgatgaaga aacactgaaa 360
gcgtggattg cgaagtgcg ttgccactaa agaatactgt tgatgcagtg gtaggaacta 420
cttctttgtg acttgcac ctaacgcttc ctggaaaaag cggcgttatt tgcatggat 480
accgaaacccg acagccttga taacatctct gctaaccctgg tcggggaccc 540
cataaacgta aactatggct ttggctgtcg gaactattgt agagacgatt ggaccagccc 600
ctttcttttg ctatcgagcc aggcgttagcg gcatatattc cggttgtca tgattatctt 660
gatgcgccccg atcaagaaaag aaaacgatag ctcggccgc atcgccgtat ataaggccaa 720
cgagtactaa tagaactacg cgggctagtt atctctcgcg agcgtgcact cgagttgcta 780
aaaccgcgtgc tggaaagatga aaaggcgctg aaggctggc aaaactagag agcgctcgca 840
cgtgagctca acgattttgg cgacgaccc ttacttttc gcgacttcca gcccgtttg 900
ctgaaatacg atcgcggtat tctggcgaac tacggcattt aactgcgtgg gattgcgttt 960
gataccatgc tggaggactt tatgctagcg ccataagacc gcttgcgtcc gtaacttgcac 1020
gcaccctaac gcaaactatg gtacgaccc tccttacattc tcaatagcgt tgccggcgt 1080
cacgatatgg acagcctcgc ggaacgttgg ttgaagcaca aaaccaggat gtaagagttt 1140
tcgcaacggc cccgactgtc atacctgtcg gagcgccttgc caaccaactt cgtgtttgg 1200
atcacttttg aagagattgc tggtaaaggc aaaaatcaac tgacctttaa ccagattgcc 1260
ctcgaagaag ccggatagtg aaaacttctc taacgaccat ttccgtttt agttgactgg 1320
aaattggct aacggggagct tcttcggct cgttacgccc ccgaagatgc agatgtcacc 1380
ttgcagttgc atctgaaaat gtggccggat ctgcaaaaac acaaagcaat gccggccgtt 1440

ctacgtctac agtggAACgt caacgtAGAC ttttACACCG gcctAGACgt ttttGTGTTT 1500
 gggccGTTGA acgtOTTcGA gaatATcGA aTgcCGCTGG tgccGGTgCT ttCAcGCATT 1560
 gAACgtAAcG gtgtGCCGG caACTTgAG aAGCtCTtAT agCTtACGG cgACcACGGc 1620
 cacgAAAGtG cgtAACTTcG attGCCACAC aAGATCgATC cgAAAGTgCT gCACAAcAT 1680
 tctGAAGAGC tcACCCtCG tctGGCTgAG ctggAAAAGA aAGCgTTCTA gCTAGGCTTT 1740
 cacgACgtGT tagTAAGACT tCTCgAGTGG gaAGCAGACc gACTCgACCT ttttCTTcGC 1800
 catgAAATTG cAGGTGAGGA attTAACCTt tCTTCCACCA aGCAGTTACa aACCATTCTC 1860
 tttgAAAAC aggGCGTGT tTAACGTcGA cTCCTTAAAT tggAAAGAAG gtggTTcGTC 1920
 aATGTTGTT aAGAGAAACT ttttGTCCTG attAAACCGC tGAAGAAAC gCCGGGTGGC 1980
 gCgCCGTCAA cgtCGGAAGA gGTACTGGAA gAACTGGCgC tGGACTAATT tGGCgACTTC 2040
 ttttGCGGCC cACCgCGCgg cAGTtGCAGC cTTTCCATG acCTTCTTGA cCGCgACCTG 2100
 tATCCGTTGc cAAAAGTgAT tCTGGAGTAT cGTGGTCTGG cGAAGCTGAA atCGACCTAC 2160
 accGACAAGC tGCGATAGG caACGTTTt cACTAAGACc tCATAGCACC AGACCgCTTC 2220
 gACTTTAGCT gGTATGTTG CTGCGACGGC CTGATGATCA ACCCGAAAC CGGGCGTGTG 2280
 cATAcCTCTT atCACCAAGGc AGTAACtGCA ACggGACGTT tATCgGACTA CTAGTGGGC 2340
 ttttGGCCCG cacACGTATG gAGAATAGTg tCCGTCATT aAGAAGGTGc tCGTATCCGc 2400
 tCAACCGATC cTAACCTGcA aAACATTCCG tGCGTAACG aAGAAGGTGc tCGTATCCGc 2460
 cAGGCGTTA ttGCGAGTTG gCTAGGATG gACGTTTGT aAGGCCACGc ATTGCTTCTT 2520
 ccAGCAGCAT aggCGTCCG cAAATAACGc CCAGAGGATT ATGTGATTGT CTCAGCGGAC 2580
 tACTCGCAGA ttGAACtGCG cATTATGGCG cATOTTcGC tGACGTTGc tGACGGTCT 2640
 TAACAGAGTC GCCTGATGAG CGTCTAACTT gACGCGTAAT ACCCGTcAGA aAGCGCACTG 2700
 AAAGGCTTGC tGACCGATT CGCgGAAGGA AAAGATAATCC ACCGGGCAAC gGCgGcAGAA 2760
 gtGTTTGGTT tGCCATTtCC gAACGACTGG CGTAAGCGCC tTCCTTTCT atAGGTGGCC 2820
 CGTTGCCGc GTCTTcACAA ACCAAACGtG CTGGAAACCG AGCGCgAAAG CGATCAACTT TGGTCTGATT TATGGCATGA 2880
 TCGCTCGTT CGGCACTCGC CTtTCGCTAG TTGAAACCAG tGACGTTGc tGACGGTCT 2940
 tTCGGTCTGG CGGCGCAATT gAACATTcCA CGTAAAGAAG ACTAAATACC GTACTCACGA 3000
 TACTTCGAAc GCTACAAAGCC AGACCGCGCC GTTAACtTGT aAGGTGcATT tCTTcGCTc 3120
 tTCATGTACt tGGAATGAA GCTTGCATG CCTGGCgTC tGGAGTATAT gGAACGcACC 3180
 CGTGTcAGG CGAAAGAGCA gGGCTACGTT gAAACGCTGG ACggGAGGACC gCACGACCTC 3240
 ATATAcCTTG CGTGGCACG AGTCCGCTT CTCGCCCCGA TGCAACTTTG CGACCTGcCT 3300
 CGCGTCTGT ATCTGCCGA TATCAAATEC AGCAATGGTG CTGTCGTc AGCGGCTGAA 3360
 CGTGCAGCCA TTAACGCGGC AGACATAGAC GGCCTATAGT tTAGGTGTT ACCACGAGCA 3420
 gCACGTGcCC GACTTGcACG TCGGTAAATTG GCGCOCATGC AGGGAAACCGC CGCCGACATT 3480
 ATCAAACGGG CGATGATTGc CGTTGATGCG TGGTACAGG CTGAGCGCgg TTACGTCCCT 3540
 TGGCGGCGGC TGTAAATAGTT TGCCCGCTAC TAACGGCAAC TACGcACCAA TGTCCGACTC 3600
 CAACCGCTG TACGTATGAT CATGCAGGTA CACGATGAAC TGGTATTtGA AGTcATAAA 3660
 GATGATGTTG ATGCCGTTGG CGCACATGCA TACTAGTACG TCCATGTGCT ACTGACCAT 3720
 AAACtTCAAG TATTTCTACT ACACtACtACGG gTCyOgAAGC AGATTcATCA ACTGATGGAA 3780
 AACtGTACCC GtCTGGATGT GCGTtGCTG GTGGAAgTGG GGAGTcAGCG CTTGTCtAA 3840
 GTAGTTGACT ACCTTTGAC ATGGGcAGAC CTACACGGCA ACgACCAcCT TCAcCCCTCA 3900
 GGCgAAAAACT GGGATCAGGC GCACTAAGAT TCGCCTGcAG CCAAGCTtAA TTAGCTGAGC 3960
 TTGGACTCCT GTTgACCGCT TTTGACCCtA GTCCGCGTGA TTCTAAGCGG ACgtCGGTc 4020
 gAAATTAAATCG ACTCGAACCT GAGGACAACT TAGATCCAGT AATGACCTCA gAAcTCCATC 4080
 TGTGTTTGTt cAGAACGCTC GTTGTGCGCC GGGCGTTTT TATTGATCTA gGTcATTACT 4140
 GGAGTCTGtA gGTAGACCTA AACAAAGTCTT GCGAGCCAAC GGCgGCCCgC AAAAATAAC 4200
 GTGAGAATCC AAGCTAGCTT GGCgAGATTt TCAGGAGCTA AGGAAGCTAA AATGGAGAAA 4260
 AAAATCACTG GATATCACTC TTAGGTTcGA TCGAACCGCT CTAAGATCC TCGATTCCTT 4320
 CGATTTTACt TCTTTTTA GTGACCTATA ACCACCGTT ATATATCCCA ATGGCATCGT 4380
 AAAGAAcATT TTGAGGcATT TCAgTcAGGT GCTCAATGTa CCTATTGGTG gCAACTATAT 4440
 AGGGTtACCG TAGCATTCT TGTAAACtC CGTAAAGTCA GTCAACGAGT TACATGGATA 4500
 AACCCAGACCG TtCAGCTGGA TATTACGGC TTTTAAAGA CGTAAAGAA AAATAAGCAC 4560
 AAGTTTtATC CGGCCTTGGT CTGGCAAGTC GACCTATAAT GCCGGAAAAA TTTCTGGCAT 4620
 TTCTTTTAT TCGTGTtCAA AATAGGCGG TTTATTcACA TTCTTGCCCG CCTGATGAAT 4680
 GCTCATCCGG AATTTCGTAT GCAATGAAA GACGtGAGC TGGTGAATA AGTGTAAAGAA 4740
 CGGGCGGACT ACTTACGAGT AGGCCTTAAAC GCAACCGTT ACTTTCTGCC ACTCGACCAc 4800
 ATATGGGATA GTGTTcACCC TTGTTACACC GTTTCCATG AGCAAAACTGA AACGTTTCA 4860
 TCGCTCTGGA GTGAATATAC CCTATCACAA GTGGGAACAA TGTGGCAAAA GGTACTCGTT 4920

tgactttgca aaagttagcga gacctcaatt taccacgacg atttccggca gtttctacac 4980
 atatattcgc aagatgtggc gtgttacggt gaaaacctgg cctatatggc gctgctaaag 5040
 gccgtcaag atgtgtat aagcgttca caccgcacaa tgccactttt ggaccggata 5100
 ttccctaaag gtttattga gaatatgtt ttcgtctcag ccaatccctg ggtgagttc 5160
 accagtttg atttaaaggg atttcccaa taactcttat aaaaaaagca gagtggta 5220
 gggaccact caaagtggc aaaaactaaat aacgtggca atatggacaa cttcttcgac 5280
 cccgtttca ccatggcaa atattatacg caaggcgaca aggtgttgc cccgttatac 5340
 ctgttgaaga agcggggca aaagtggtac ccgttataa tatgcgttcc gctgttccac 5400
 ctgatgccgc tggcgattca gtttcatcat gccgtttgt atggcttcca tgcggcaga 5460
 atgcctaattt aatttagacta cggcgaccgc taagtccaa tagtacggca aacactaccg 5520
 aaggtacagg cgtcttacga attacttaat caacagtact gcgatgatg gcaggcgccc 5580
 gcttaatttt ttttaaggcag ttattggtc ccttaaacgc ctgggggttcatgac 5640
 ctcaccgtcc cgccccgcat taaaaaaatt ccgtcaataa ccacgggaat ttgcggaccc 5700
 gtaatgactc tctagttga ggcataaaat aaaacgaaag gctcagtcg aagactggc 5760
 ctttcgtttt atctgcattt ctgagagatc gaactccgtt gtttattttt cttccgagt 5820
 cagctttctg acccgaaaag caaaatagac ttgtttgtcg gtgaacgctc tcctgagtag 5880
 gacaaatccg ccctctagag ctgcctcgcc cggttccgtt atgacaacaa acagccactt 5940
 gcgagaggac tcatctgtt taggcgggag atctcgacgg agcgcgcaaa gccactactg 6000
 ggtgaaaacc tctgacacat gcaactcccg gagacggtca cagttgtct gtaagcggat 6060
 gccgggagca gacaaccact ttggagact gtgtacgtcg agggcctctg ccagtgtcga 6120
 acagacattt gcctacggcc ctcgtctgtt gcccgtcagg ggtgtcgccc ggcgtcagc 6180
 ggcgtcagccat gacccagtcg cgtacgcata agtcgcccac aaccgcccac agcccccgtt ctagtgcattc gctatcgcc 6240
 gtttatactg gcttaactat gcccgtatc agcagattgt gtcgtgtct acgtgatc 6300
 ggtgtgaaat accgcacat atgaccgaat tgataacggc tagtctgttcc 6360
 ctcacgtgtt atacgccaat ctttatggcg acagatgcgt ggcgtcttc cgcttccgtt ctcactgact cgctgcgctc 6420
 ggcgtcttc gtcgtgttcc 6480
 cttttatggc gtagtccgtt agaaggcgaa ggagcgagtg ttcggctcg gcgagcggtt tccatgactc 6540
 ttcggctcg gcgagcggtt tccatgactc 6600
 cagggataaa cgcagaagcc gacccgtc gccatagtcg aatacggtt tccacagaat 6660
 ccaataggtt tcttagtccc ctattgcgtt gaaagaacat agtgcgttcc 6720
 aggccaggaa cgcgtaaaaag gccgcgttgc tggcggtttt gtcgtgttcc 6780
 gttttccgtt cggtttccgg tccctggcat ttttccggcg ggcgtccccc ccatacttcc 6840
 ccctgacggc catcacaaaa atcgcgtc gacaggact ataaaccggc ggggggggac tgcgtgttcc 6900
 ttcgcgtc tttggctgt cctgatattt gataccaggc aacgcgttcc 6960
 tctccaccgc ttcggctcg accctgcgc ttaccggata gtcgtgttcc 7020
 tctccaccgc ttcggctcg accctgcgc ttaccggata gtcgtgttcc 7080
 tctccaccgc ttcggctcg accctgcgc ttaccggata gtcgtgttcc 7140
 ggggaccttc gagggagcac gcgagaggac aaggctggga cggcgttcc 7200
 ccgcctttct cccttccggc aacgcgttcc 7260
 gtcgtgttcc 7320
 cgcacatccat agactcaagc cccatccacg ttcgtctccaa gtcgtgttcc 7380
 cccccgttca gcccgttcc tccatggcattt ccgttaacta tcgtcaagcg aggttcgacc 7440
 cgcacacacgt gtcgtgttcc 7500
 tttagtccaa cccgttaaga cacgacttac gtcgtgttcc 7560
 tttagcagac gaggtaactc aggttggggc attctgtgttcc 7620
 ggtgaccatt gtcgttccatcg ttcgtctccaa atgttagggcg tgcgtgttcc 7680
 ggtggcttca ctacggctac actagaagga cagtattttt gtcgtgttcc 7740
 gtcgtgttcc 7800
 gtcgtgttcc 7860
 gtcgtgttcc 7920
 gtcgtgttcc 7980
 ttacgcgtc aaaaaaaggat ttcgttcc 8040
 aacacgttcc 8100
 ctacgggttcc 8160
 tatcttacat ccgttcc 8220
 aaaaccaggta ctctaaatgtt tttccatgtt ccgttcc 8280
 gttttaaatc aatctaaatgtt atatatgttcc 8340
 atttaatttt tacttccaaa tttagttaga ttccatataactcatttgc accagactgtt 8400

gttaccaatg cttaatcgt gaggcaccta tctcagcgat ctgtctatit cgttcatcca 8460
 tagttgcctg actccaaatg gttacgaatt agtcactccg tggatagagt cgctagacag 8520
 ataaaagcaag taggtatcaa oggactgagg ccgtcgtgta gataactacg atacgggagg 8580
 gettaccatc tggcccccagt gctgcaatga taccgcaga cccacggcag cacatctatt 8640
 gatgctatgc cctcccgaaat ggttagacccgg ggtcacgacg ttactatggc gctctgggtg 8700
 gtcacccggc tccagattta tcagcaataa accagccagc cggaaggccc gagcgcagaa 8760
 gtggcctgc aacttcgagt gggcgaggc taaaatagtcg ttatggc ggtggcctt 8820
 cccggctcgc gtcttacca ggacgttcaa tatccgcctc catccagatctt attaattgtt 8880
 gcccggaaagg tagagtaatg agttcgccag taaaatagttt ggcacatagg cggaggtagg 8940
 tcagataatt aacaacggcc cttcgatctc attcatcaag cggtaatttcaaaacgcgt 9000
 aogttgttgc cattgtaca ggcacgttgg tgtaacgctc gtcgtttgtt atggcttcat 9060
 tcagctccgg ttccctgcaa caacggtaac gatgtccgta gcacccacgt gcgagcagca 9120
 aaccataccg aagtaagtgc aggccaaggg aacgatcaag gcgagttaca tgatccccca 9180
 tttgtgcaa aaaagcggtt agctccctcg gtcctccgat ctttttttttgc agttccgctc 9240
 aatgtactag ggggtacaac acgttttttc gccaatcgag gaagccagga ggtagcaac 9300
 tcagaagtaa gttggccgca gtgttatac tcatggttt ggcacactg cataattctc 9360
 ttactgtcat gccatagtct tcatttcaacc ggcgtcacaat tagtgagttac caataccgtc 9420
 gtgacgtatt aagagaatga cgtacggta cggtaagatg cttttctgtg actgggtgagt 9480
 actcaaccaa gtcattctga gaatagtgtt tgccggcacc gagttggcat tctacgaaaa 9540
 gacactgacc actcatgagt tgggttca gacatctt cacatacgcc gctggctaa 9600
 gtccttgcgc ggcgtcaata cgggataata ccgcgcaca tagcagaact taaaatgtc 9660
 tcatttcatgg aaaaccgaga acggggccgca gttatggccattatggc ggtgtatcgt 9720
 ctgtttttttt tcacgagtag taacctttt gtttttgc gcgaaaaactc tcaaggatct 9780
 taccgtgtt gagatccagt tcgatgttac ccactcgtc acccacaaga agcccccgtt 9840
 ttgagagttt ctagaatggc gacaactcta ggtcaagcta cattgggtga gcacgtgggt 9900
 actgatcttc agcatctttt actttcacca ggtttctgg gtgagcaaaa acaggaaggc 9960
 aaaaatgccgc aaaaatgact agaagtcgta gaaaatgaaa gtggtcgcaaa agacccactc 10020
 gtttttgc ttccgtttt cggcggtttt agggataaa ggcacacacgg aatgttgc 10080
 tactcataact cttccctttt caatattttt gaagcattt ttcaggccctt tattcccgct 10140
 gtgcctttac aacttatgag tatgagaagg aaaaagttt aataacttcg taaaatagtcc 10200
 gtatttgcattt catgagcggta tacatattttt aatgtattt gaaaataaa caaatagggg 10260
 ttccgcgcac atttccaata acagagtact cgcctatgtt taaaacttaca taaaatcttt 10320
 tatttgcattt tccccaaaggc ggcgtttaaaag cccggaaaatg gccacctgac gtctaagaaa 10380
 ccatttattt catgacatttta acctataaaa ataggcgtat caccgggtt tttcacgggt 10440
 gactgcagat ttttttttttta taatagtact gtaattttt gatatttttcc gcatagtgc 10500
 ggccttttcg tttttttttttaaaacccg gggaaaggcaga agtg 10534

<210> 27
 <211> 11
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

<220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
 Matrizenausschnitt (SEQ ID NO: 14); w = t,
 Wildtyp ; w = a, mutante Matrize

<400> 27
 ctaaagwgac a

11

<210> 28
 <211> 11
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
Matrizenabschnitt (SEQ ID NO: 16); r = g,
Wildtyp; r = a, Mutante

<400> 28
gtgaatrcaa c

11

<210> 29
<211> 11
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
Matrizenabschnitt (SEQ ID NO: 12); r = t,
Wildtyp; r = a, Mutante

<400> 29
taaggaycgg a

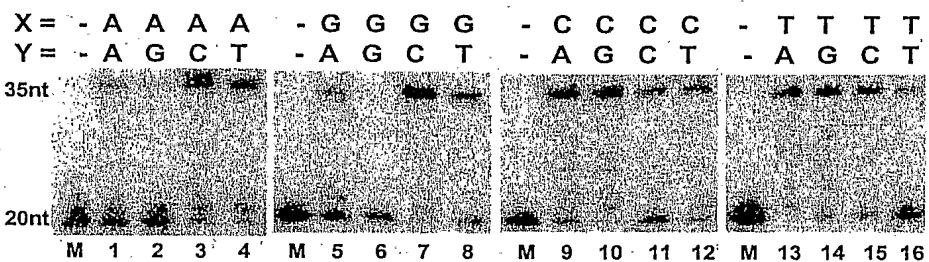
11

Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft DNA-Polymerasen mit einer speziellen Mutation, die eine erhöhte Fehlpaarungs-Diskriminierung aufweisen, deren Herstellung und Verwendung. Die thermostabilen DNA-Polymerasen mit dieser Mutation sind besonders für diagnostische und molekularbiologische Verfahren, z.B. allel-spezifische PCR geeignet.

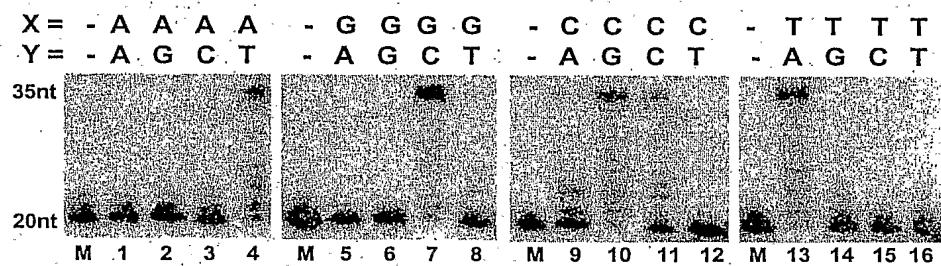
a

Wildtyp (QVH):



b

LVG:



c

LVL:

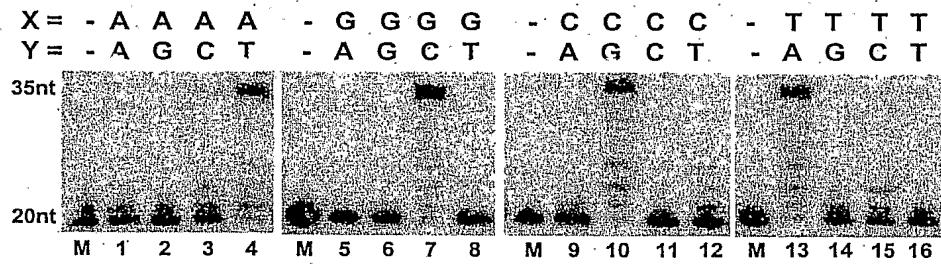


Fig.1

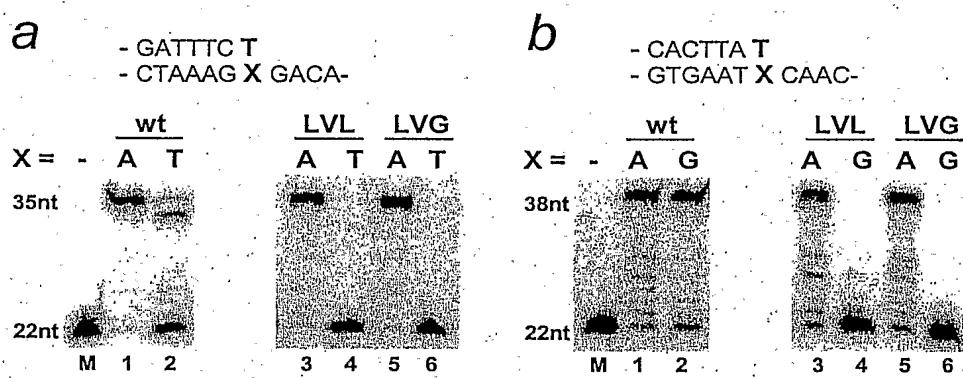


Fig.2

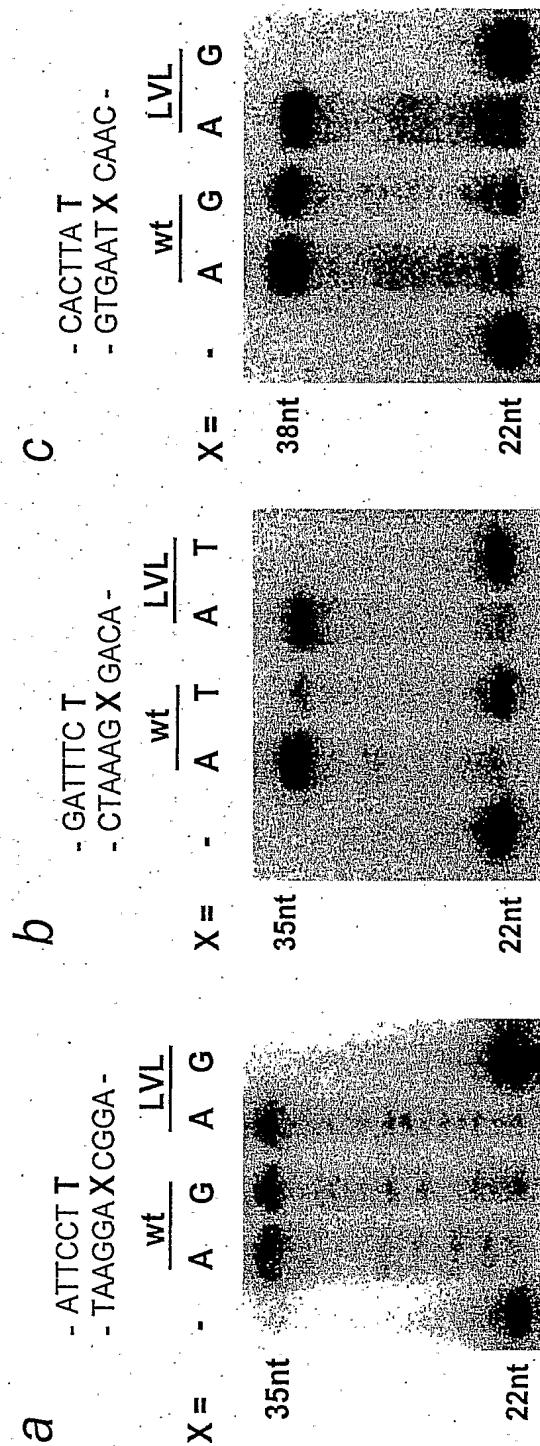


Fig.3

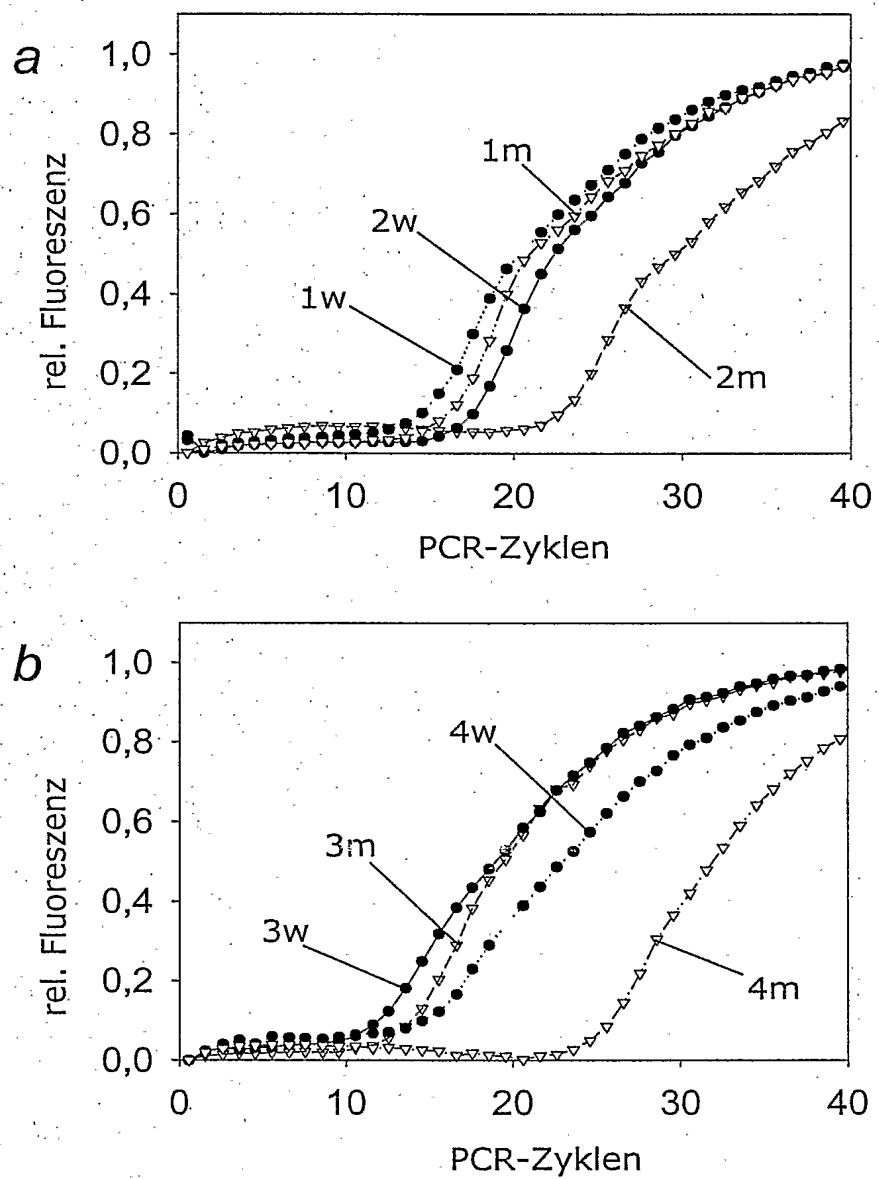


Fig.4